DAN VALENTINA

MICROBIOLOGIA PRODUSELOR ALIMENTARE
Volumul I

- Morfofiziologia microorganismelor cu implicații în industria alimentară
- Factori de control ai creșterii microbiene
- Fermentații



Editura Alma
S.C. Alma-Galați S.A.
România

Descrierea CIP a Bibliotecii Naționale
DAN, VALENTINA
Microbiologia produselor alimentare / Dan Valentina. - Galați : Alma., 1999 -
2 vol. ; 24 cm.
ISBN 973-9290-50-7
Vol. 1. - 1999. - 208 p. - Bibliogr. - ISBN 973-9290-51-5

579.67

CAPITOLUL 1
DEZVOLTAREA ŞTIINŢELOR MICROBIOLOGICE

În ultimele decenii ale secolului XX, ştiinţele microbiologice s-au implicat tot mai profund în practica industrială şi pe baza acumulării de noi cunoştinţe, se dezvoltă continuu în ritm accelerat, biotehnologia. Creşterea spectaculoasă a populaţiei globului şi ca o consecinţă a eradicării unor boli microbiene este corelată cu efortul unanim pentru creşterea calităţii vieţii, inclusiv prin asigurarea unei alimentaţii corespunzătoare, diversificată şi completă, pentru menţinerea stării de sănătate şi vigoare umană. În acest context, microbiologia produselor alimentare îndeplineşte un rol primordial, deoarece majoritatea subramurilor industriei alimentare au la bază biotehnologii microbiene. Calitatea, gradul de inocuitate şi conservabilitate ale alimentelor sunt dependente de manipularea dirijată, pe criterii ştiinţifice a microorganismelor utile, de păstrare riguroasă a condiţiilor igienico-sanitare la prelucrarea şi păstrarea alimentelor, în scopul prevenirii alterărilor sau a îmbolnăvirilor prin consum de alimente contaminate.

A.J. Kluyver (1924) afirma: *"În lumea microbilor, omul are cel puţin tot atâţia prieteni, câţi duşmani"*, dar indiferent de ce parte a baricadei sunt arbitrar situaţi, numai prin aprofundarea cunoaşterii microorganismelor, omul va şti mereu să le stăpânească.

1.1 ISTORICUL MICROBIOLOGIEI

Dacă apariţia vieţii pe pământ se aproximează că a avut loc cu 3,8-4 miliarde de ani în urmă, cele mai vechi celule aparţinând arhebacteriilor - bacterii metanogene şi bacterii ale genului *Clostridium* descoperite în lave vulcanice pietrificate, au existat de cel puţin 2 miliarde de ani. Pe scara evoluţiei, celulele eucariote s-au transformat cu 1500 milioane de ani în urmă şi diversificarea acestora acum 400 milioane de ani, a condus la apariţia într-o lungă perioadă de timp a strămoşilor plantelor de astăzi (Zarnea G. 1984). Indiferent dacă suntem adepţii darwinismului privind apariţia şi evoluţia omului, sau credem în originea sa extraterestră, trebuie admis că microorganismele au populat pământul cu mult înaintea acestuia şi au folosit timpul în avantajul lor, adaptându-se la cele mai diferite condiţii şi habitaturi naturale, supravieţuind şi perfectându-şi necontenit metabolismul. În acest

sens F. Jacob sublinia cu admiraţie: *"Dacă o bacterie funcţionează cu virtuozitate, aceasta se datoreşte faptului că strămoşii săi şi-au exercitat dibăcia în această chimie timp de 2 miliarde de ani, notându-şi cu conştiinciozitate reţeta fiecărei reuşite"*.

În contrast cu dimensiunile atât de mici ale microorganismelor, rolul lor în natură este imens. Implicate direct în uriaşele transformări ale materiei organice nevii, prin procese de putrefacţie-putrezire, fermentaţii ş.a., microorganismele asigură în natură un circuit al principalelor elemente universale ce intră în structura organismelor vii şi au un rol vital în menţinerea ecosistemelor, deoarece fără activitatea lor *"pământul s-ar transforma într-un uriaş cimitir"* (Fedorov V.M., 1957).

Invizibile pentru ochiul uman şi deci mult timp nebănuite, microorganismele dintotdeauna şi-au împletit activitatea cu viaţa şi moartea. Încă în secolul trecut, epidemii grave din care se pot aminti: ciuma, tifosul, dizenteria, variola ş.a. ce decimau uneori până la 80% din populaţii nu au putut fi controlate de om, ca urmare a necunoaşterii cauzelor care le-au provocat (Duca E., 1972).

Există însă şi evidenţe că omul a beneficiat de activitatea utilă a unor microorganisme din cele mai vechi timpuri. Astfel în basoreliefuri descoperite în Egipt, ce datează din anii 2400 î.e.n. apar scene de fabricare ale vinului şi pâinii; berea era cunoscută de babilonieni cu 6000 ani î.e.n. (Gorbuleva, 1984).

Deşi procesele microbiene sunt cunoscute de la începutul omenirii, explicaţia ştiinţifică a cauzelor care le determină, a fost posibilă numai odată cu descoperirea microscopului, care a permis extinderea simţurilor umane dincolo de limita lor normală de percepţie. Odată cu dezvoltarea fizicii a fost posibilă construirea aparatelor optice de mărire a obiectelor înconjurătoare. Primul aparat de acest tip a fost construit în 1590 de Zaccharias şi Hans Jansen (Olanda), iar in jurul anului 1610 de către Galileu (Italia).

Primul om care şi-a strecurat privirea în lumea fascinantă a microorganismelor descoperindu-le existenţa a fost **Anthonie van Leeuwenhoek** (1632-1723). Kluyver A.J. consideră ca zi de naştere a bacteriologiei data de 24 aprilie 1676 când Leeuwenhoek comunică Societăţii Regale de Ştiinţă din Londra, observaţiile sale asupra unei fermentaţii anaerobe. Deja din 1675, în lucrarea sa *"Tainele naturii descoperite cu ajutorul microscoapelor"* sunt publicate date despre forma şi dimensiunile acestor "animalcule", pe care le studiază cu o deosebită tenacitate şi pe care le descoperă în cele mai diferite medii naturale (Zarnea G., 1982).

Microbiologia apare ca ştiinţă în a II-a jumătate a secolului al XVII şi debutează cu o perioadă lungă de observaţii morfologice când se acumulează un material vast privind caracterele şi răspândirea în natură a microorganismelor.

În perioada morfologică ce a durat aproximativ 200 de ani se remarcă lucrările lui **Lazzaro Spalanzani** care prin experimentări infirmă (în 1799)

teoria generaţiei spontanee susţinută de unii clerici, care considerau că dezvoltarea proceselor microbiene este datorată unor forţe vegetative de origine divină, demonstrând provenienţa şi înmulţirea microbilor.

Cea de a II-a perioadă în dezvoltarea microbiologiei este perioada fiziologică, inaugurată de lucrările marelui savant, chimist şi medic, **Louis Pasteur** (1822-1895) care a stabilit principiile de bază ale microbiologiei prin descoperiri de importanţă fundamentală.

Louis Pasteur studiază condiţiile de distrugere a microorganismelor stabilind procedee de sterilizare şi metodică aseptică în practica de laborator. Prin experimentări, confirmă descoperirile lui Cagniard Latour (1836), Kutzing (1837) privind rolul drojdiilor în fermentaţia alcoolică şi demonstrează că fiecare proces fermentativ este datorat unui microorganism specific. Studiază bolile microbiene ale vinului şi berii produse de microorganisme - agenţi ai fermentaţiei lactice şi butirice şi care pot să trăiască şi în absenţa aerului. Stabileşte modul de tratament al vinului prin încălzire la 60°C care îi asigură conservabilitatea, operaţie denumită în prezent **pasteurizare** şi este pe drept cuvânt, considerat părintele microbiologiei industriale. Visul lui L. Pasteur era să descopere microbii care provocau îmbolnăviri ale omului şi animalelor. Pe tărâm medical a demonstrat legătura cauzală dintre microbi şi boală ajungând la concluzia fundamentală că bolile sunt produse de microbi care se înmulţesc în organismul viu şi trecând de la un individ la altul pe diferite căi de contaminare, generază epidemii. Aceste concluzii demonstrate prin studiul unor boli ca: holera găinilor, infecţia cărbunoasă, sepsia puerpurală ş.a. şi descoperirea agenţilor care le produceau, a stimulat dezvoltarea microbiologiei medicale. L. Pasteur realizează pentru prima dată vaccinurile: antiholeric şi antirabic, dovedind că unul şi acelaşi microb este cel care poate produce moartea, în schimb după un tratament adecvat poate da doar forme uşoare de boală şi concomitent o imunitate organismului vaccinat. Până în ultima clipă a vieţii a muncit neobosit pentru binele omenirii. Impresionant este crezul vieţii lui, exprimat simplu în cuvintele: *"Voinţa, munca şi succesul sunt cuprinsul vieţii omeneşti. Voinţa deschide porţile, munca te trece prin ele, iar la sfârşitul drumului vine succesul ca o încoronare a tuturor eforturilor"* (Maurois A., 1978).

Prin contribuţiile lor la dezvoltarea ştiinţelor microbiologice, se mai remarcă:

Robert Koch (1843-1910) considerat părintele şcolii germane de microbiologie, stabileşte că microbii sunt cauzele bolilor infecţioase şi descoperă vibrionul holerei, agentul tuberculozei, studii ce-i aduc în 1905 premiul Nobel pentru fiziologie şi medicină. Introduce în practica de laborator mediile de cultură solidificate ceea ce a permis izolarea în culturi pure a microorganismelor din natură. Folosirea culturilor s-a extins odată cu realizarea de aparatură destinată sterilizării mediilor necesare pentru cultivare.

Un rol important în introducerea culturilor pure în industrie aparţine savantului german E.H.Hansen (1842-1909) care deschide calea microbiologiei industriale moderne, prin utilizarea microorganismelor, drept starteri ai fermentaţiilor.

În dezvoltarea biochimiei, o remarcabilă descoperire aparţine lui **Eduard Buchner** care în 1897 a arătat că fermentaţia alcoolică se poate produce şi în prezenţa unui extract de drojdie obţinut după distrugerea mecanică a pereţilor celulari, punând astfel în evidenţă natura enzimatică a fermentaţiilor.

O nouă ştiinţă microbiologică, virusologia, începe să se dezvolte începând cu anul 1892 când **D.I. Ivanovski** deduce prin experimentări, existenţa unor noi forme acelulare de viaţă - virusuri (inframicrobi), cu dimensiuni submicroscopice.

Descoperirea primului antibiotic - penicilina de către **A. Fleming** (1928) şi stabilirea tehnologiei de producere şi purificare de către **Florey şi Chain** (1940), reprezintă una dintre cele mai importante realizări ale începutului de secol XX. Omenirea devine astfel posesoarea unei noi arme împotriva microorganismelor patogene şi sunt intens stimulate cercetările de descoperire şi aplicare în terapeutică a noi antibiotice cu spectru specific de acţiune.

Era modernă a biologiei moleculare începe din 1953 când **J.D. Watson** şi **F.M. Crick** au dedus structura dublu helicoidală a ADN-ului, ceea ce a făcut posibilă cunoaşterea modului în care genele guvernează activitatea celulară şi se produce biosinteza proteinelor (Prescott ş.a., 1990).

Alături de marii microbiologi ai lumii se impun prin cercetările lor şi numeroşi savanţi români.

Fondatorul microbiologiei româneşti este **Victor Babeş** (1854-1926), care a condus prima catedră de învăţământ medical de anatomie patologică şi bacteriologie. Împreună cu V. Cornil (Franţa) este autorul primului tratat de bacteriologie apărut în lume: *"Les bactéries"*, 1885. Unul dintre cei mai mari savanţi ai timpului, a rămas în microbiologie prin numeroasele sale descoperiri. Studiind boli ca: turbarea, morva, lepra, holera, tuberculoza, parazitoze, introduce pentru prima dată în ţara noastră tratamentul prin seroterapie - imunizare cu serul provenit de la animale în prealabil vaccinate. O contribuţie importantă o are în diagnosticarea retrospectivă a turbării, prin descoperirea unor corpusculi în sistemul nervos al animalelor decedate, denumite corpusculi Babeş - Negri, precum şi în prepararea unor vaccinuri, în perfecţionarea tehnicilor de laborator.

Ioan Cantacuzino (1863-1934) a creat o şcoală de microbiologie având ca centru institutul care îi poartă numele, organizând şi dezvoltând activitatea de producţie a serurilor şi vaccinurilor folosite îm combaterea bolilor infecţioase.

În domeniul imunologiei, virusologiei şi microbiologiei generale, se remarcă savanţii: **C. Lavaditi, D. Combiescu, M. Ciucă, Şt. Nicolau** ş.a. care şi-au consacrat activitatea ştiinţifică, combaterii şi eradicării unor boli, pentru formarea şi dezvoltarea şcolii contemporane de microbiologie.

O contribuţie valoroasă în dezvoltarea microbiologiei produselor alimentare în ţara noastră a adus-o prof.dr.doc. **Moţoc Dumitru** (1989 - 1969), organizator şi decan al Facultăţii de Industrie Alimentară (Bucureşti 1948 - Galaţi 1968), prin numeroasele sale lucrări din care peste 100 privind procesele biochimice ale microorganismelor, manuale, monografii şi prin activitatea de formare a cadrelor de specialişti din învăţământ şi industria alimentară.

1.2. CLASIFICAREA ŞI OBIECTUL DISCIPLINELOR MICROBIOLOGICE

Microbiologia este o ştiinţă biologică fundamentală care studiază morfologia, fiziologia şi sistematica microorganismelor, originea şi evoluţia lor, fenomenele de ereditate şi variabilitate microbiană cuprinzând un sistem organizat de cunoştinţe privind legile după care se desfăşoară viaţa microorganismelor. Etimologia cuvântului din limba greacă are următoarele semnificaţii: micros=mic; bios=viaţă; logos=ştiinţă.

Microorganismele reprezintă sisteme cu organizare complexă, monocelulare sau pluricelulare, cu metabolism propriu şi continuitate genetică, cu o infinită diversitate a caracterelor morfologice şi fiziologice. În sensul acestei definiţii din imensul grup al microorganismelor fac parte fungii - drojdii (levuri) şi mucegaiuri (fungi filamentoşi), bacterii, alge microscopice, protozoare ş.a.

În funcţie de natura microorganismelor şi caracterul lor aplicativ, s-au dezvoltat în timp, următoarele ştiinţei microbiologice independente:

Microbiologia generală studiază legile de dezvoltare a tuturor grupelor de microorganisme şi a rolului lor în circuitul substanţelor în natură. Fiind o ştiinţă de sinteză, în funcţie de natura microorganismelor studiate s-au desprins următoarele discipline microbiologice:

- **Virusologia** (inframicrobiologia) studiază virusuri - entităţi acelulare cu dimensiuni submicroscopice, agenţi ai bolilor virale la om, animale, plante, insecte, microorganisme (bacterii, fungi).
- **Bacteriologia** - studiază bacterii - celule monocelulare de tip procariot, care pot produce îmbolnăviri ale omului, animalelor, plantelor.
- **Micologia** - studiază fungi cu celule monocelulare sau pluricelulare de tip eucariot.

Dintre ştiinţele microbiologice cu caracter aplicativ fac parte:

Microbiologia chimică - ramură a microbiologiei generale care s-a dezvoltat în ultimii 50 de ani, are ca obiect de studiu chimia şi biochimia microorganismelor (compoziţia chimică, structura, topologia, funcţia moleculelor libere şi asociate, metabolismul substanţelor în celula microbiană) (Elinov H.P., 1989).

Microbiologia solului, a apei, microbiologia geologică, fitopatologia, microbiologia sanitară, agricolă, ecologică, cosmică, genetica microbiană, biologia moleculară, reprezintă tot atâtea discipline biologice de interes specific.

Dintre ştiinţele microbiologice aplicative, importante pentru pregătirea specialiştilor din industria alimentară, fac parte următoarele:

Microbiologia produselor alimentare are drept obiect de studiu, cunoaşterea naturii şi activităţii metabolice a microorganismelor care pot contamina materiile prime, semifabricatele, produsele finite, în scopul prevenirii alterării lor şi pierderea valorii alimentare, sau a îmbolnăvirii prin consum de alimente contaminate cu microorganisme patogene-toxicogene. În cadrul disciplinei sunt studiate şi microorganismele utile folosite drept culturi starter ale fermentaţiilor ce stau la baza biotehnologiilor alimentare. O atenţie deosebită este dată controlului microbiologic şi igienico-sanitar în diferite etape tehnologice de prelucrare şi păstrare a produselor alimentare, pentru prevenirea contaminărilor microbiene şi respectarea normelor/standardelor microbiologice. Microbiologia produselor alimentare este strâns corelată cu înţelegerea şi cunoaşterea disciplinelor tehnologice de specialitate, deoarece majoritatea acestora se bazează pe studiul temeinic al proprietăţilor microorganismelor şi a activităţii lor metabolice.

Microbiologia industrială (tehnică) reprezintă ştiinţa de investigare şi control al fermentaţiilor, respectiv de folosire a microorganismelor în calitate de "reactivi", în scopul obţinerii industriale a unor produse cu valoare economică. Prin dezvoltarea microbiologiei industriale, în prezent, cu ajutorul microorganismelor se obţin avantajos aproximativ 200 de produse, printre care: alcoolul etilic şi butanolul, acetona, acizii: citric şi lactic, aminoacizi, enzime, proteine, vitamine, insecticide biologice, produse de biosinteză ce se obţin pe plan mondial în cantităţi de mare tonaj (milioane tone/an) sau produse de tonaj redus: vaccinuri, vitamine şi enzime purificate, hormoni de creştere, interferonul, antibiotice.

Microbiologia industrială se ocupă şi de procesele microbiologice ce au loc la prelucrarea materiilor prime agroalimentare, de studiul metodelor de conservare a alimentelor şi de aspectele microbiologice din industria textilă şi a fibrelor.

Primul patent înregistrat pentru un produs de biosinteză microbiană datează din 1882 pentru enzime proteolitice folosite la tăbăcirea pieilor. Începând din secolul XIV în majoritatea ţărilor se obţine prin distilare spirtul (alcoolul etilic obţinut prin fermentaţie). În Germania, Karl Neuberg (1918) pune la punct procedeul industrial de obţinere a glicerolului folosit la fabricarea nitroglicerinei. Tot pentru industria de război a fost necesară dezvoltarea industrială a fermentaţiilor cu ajutorul culturilor pure, pentru obţinerea de acetonă şi alţi solvenţi.

Acidul citric se obţine prin biosinteză încă din 1930 proces ce a afectat industria Italiei, producătoare de fructe citrice din care acest acid se producea prin extracţie cu un randament scăzut de 17%. Vitaminele se obţin industrial din 1930, dextranul din 1944, antibioticele din 1945 şi seria produselor de biosinteză microbiană continuă ascendent înregistrând în timp, progrese remarcabile.

Biotehnologia - reprezintă un domeniu multidisciplinar al ştiinţei, tehnicii, tehnologiei şi al producţiei industriale, care realizează cele mai avansate cuceriri pe care le fuzionează în concepte relativ noi, ce se încadrează în aşa numitele tehnologii cu conţinut ridicat de inteligenţă, (Florescu M. 1986).

Biotehnologia include în obiectivele sale, utilizarea integrală a biochimiei, biologiei moleculare, microbiologiei, ingineriei microelectronice şi informaticii, pentru realizarea de tehnologii bazate pe potenţialul microorganismelor rezultate prin tehnici de inginerie genetică şi a enzimelor microbiene, în scopul obţinerii de bunuri industriale, energetice, agricole, farmaceutice, alimentare şi protecţia mediului.

Ca urmare a progresului ştiinţific şi tehnic în domeniul biotehnologiei, s-au obţinut realizări importante în biosinteza microbiană a enzimelor, antibioticelor, vitaminelor, hormonilor şi a altor compuşi, de uz industrial sau medical, prin folosirea agenţilor selecţionaţi sau realizaţi prin tehnici de inginerie genetică.

Biotehnologia mai include în sfera sa de activitate, utilizarea surselor biologice regenerabile pentru producerea de energie sau a purtătorilor de energie, obţinerea de biomasă microbiană cu un conţinut ridicat în proteine pentru uz furajer precum şi prelucrarea microbiologică a reziduurilor industriale şi casnice, în scopul asigurării unui echilibru ecologic normal, utilizarea microorganismelor şi a produselor lor de biosinteză în industria minieră extractivă (Topală N., 1986).

Folosirea dirijată a metodelor biotehnologice a fost mult extinsă în industria alimentară, în care numeroase subramuri au la bază procese microbiologice de biosinteză, biodegradare sau bioconversie.

Rolul biotehnologiei în procesarea alimentelor este foarte extins. Conform specificaţiilor Comitetului Canadian de Biotehnologie alimentară (Anon, 1988), biotehnologia alimentară implică procese de manipulare a enzimelor libere sau imobilizate, ca şi a celulelor, pentru îmbunătăţirea calităţii alimentelor, prelungirea duratei de consum a fructelor şi legumelor, analiza compoziţiei chimice, analiza toxicologică. Biotehnologia alimentară include procesele microbiene de fermentaţie (datorate activităţii enzimelor intracelulare şi extracelulare), cu rol în creşterea aromei produselor fermentate, pentru conservarea alimentelor, pentru producerea de biomasă.

Dezvoltarea biotehnologiei va influenţa diversificarea industriei alimentare. De exemplu prin modificarea componentelor alimentului îi va asigura proprietăţi noi sau proprietăţi funcţionale ameliorate; prin dezvoltarea de senzori cu enzime imobilizate se vor introduce metode noi de analiză, prin noi procese de producere a alimentelor sau a componentelor lor (folosirea culturilor de celule vegetale pentru obţinerea de aromatizanţi), se va asigura diversificarea şi vor fi perfectate tehnici de detoxifiere a unor produse (îndepărtarea acidului erucic din ulei de rapiţă, a cafeinei din cafea, îndepărtarea gustului amar ş.a.). Este important de subliniat că, inginerul de industrie alimentară prin pregătirea sa în domeniul chimiei, microbiologiei, biochimiei, completată cu cunoştinţele dobândite la disciplinele tehnologice, de procese şi operaţii, utilaj ş.a. poate să desfăşoare o activitate eficientă şi în domeniul biotehnologiei; de altfel, numeroase secţii, cum ar fi cele destinate obţinerii acizilor organici, a drojdiei comprimate şi furajere, de obţinere a culturilor pure cu utilizări industriale ş.a., sunt conduse de ingineri de industrie alimentară. Începând din 1995-1996 la Facultatea de Industrie Alimentară Acvacultură şi Pescuit, Universitatea "Dunărea de Jos" Galaţi este înfiinţat profilul Biotehnologie, cu specializarea Biotehnologie aplicată ce pregăteşte ingineri în domeniu.

CAPITOLUL 2
CLASIFICAREA GENERALĂ A MICROORGANISMELOR

Variabilitatea extraordinară a microorganismelor şi capacitatea lor de adaptare la cele mai diferite condiţii ale mediului ambiant, fac ca lumea microbiană la nivel planetar să fie deosebit de numeroasă şi greu de clasificat.

Taxonomia (sistematica) este ştiinţa care se ocupă de clasificarea biologică şi constă din trei părţi aflate în strânsă conexiune:

Clasificarea - aranjarea organismelor în grupe pe bază de similaritate şi evoluţie,

Nomenclatura - denumeşte grupele taxonomice

Identificarea - reprezintă latura practică ce constă din procedee prin care se poate dovedi dacă o cultură microbiană particulară izolată din mediul său natural aparţine unui grup recunoscut taxonomic.

Ca urmare a aprofundării cunoştinţelor în domeniul microbiologiei, deoarece prin caracterele lor specifice unele microorganisme nu pot fi clasate în nici unul dintre cele două regnuri tradiţionale ale lumii vii (vegetal şi animal), încă din 1866, Haeckel a propus crearea unui nou regn PROTISTA în care să fie grupate formele inferioare de viaţă. În baza acelei clasificări, Stainer în anul 1970 împarte regnul PROTISTA în două subgrupe: protiste inferioare în care au fost clasificate microorganismele procariote bacterii/actinomicete şi protiste superioare în care au fost incluse microorganisme eucariote - drojdii şi mucegaiuri.

Clasificarea biologică a lumii vii propusă de **Whittaker** (1969), acceptată de numeroşi taxonomişti cuprinde un sistem de cinci regnuri în funcţie de modul de organizare celulară şi modalităţi de nutriţie, având următoarea structură:

- **Regnul Monera** - include organisme monocelulare de tip procariot cu nutriţie de tip absorbtiv, cu metabolism fotosintetic sau chimiosintetic. Reproducere prin diviziune asexuată.
- **Regnul Protista** - include organisme monocelulare de tip eucariot (inclusiv drojdii). Modul de nutriţie este diferit de la un grup la altul, prin absorbţie sau ingestie. Reproducerea - sexuată/asexuată.
- **Regnul Fungi** - cuprinde organisme multinucleate de tip eucariot (mucegaiuri) cu nuclei dispersaţi în citozolul hifelor adesea septate, lipsite de plastide şi pigmenţi fotosintetici, cu nutriţie de tip absorbtiv. Reproducere pe cale sexuată şi asexuată.

- **Regnul Plantae** - cu organisme multicelulare de tip eucariot, cu perete celulozic, vacuole în citoplasmă şi pigmenţi fotosintetici în plasmide. Modul principal de nutriţie este cel fotosintetic. Reproducere predominant sexuată.
- **Regnul Animalia** - cu organisme multinucleate de tip eucariot fără perete celular, cu nutriţie predominant prin ingestie şi reproducere sexuată (Zarnea G., 1983).

În sistematica generală a microorganismelor majoritatea biologilor contemporani admit unităţi taxonomice superioare regnurilor, stabilite pe criterii de diferenţiere a celulei - unitatea fizică elementară ce stă la baza vieţii. (Tabel 1).

Celula de tip procariot ce aparţine primelor forme de viaţă pe Pământ, prezintă un nucleoid nediferenţiat, lipsit de membrană nucleară. Molecula de ADN conţine întreaga informaţie genetică; celula procariotă nu conţine în citozol organite libere (cu membrană) şi ribozomii au dimensiuni mici. Sunt puţin diferenţiate din punct de vedere morfologic.

Celula de tip eucariot, mai evoluată, prezintă un nucleu bine diferenţiat în care este inclusă partea predominantă a genomului alcătuit dintr-un set de cromozomi, care în timpul procesului de înmulţire se divizează şi se repartizează între celulele rezultate. În cromozomi, ADN-ul este cuplat cu proteine de tipul histonelor. În celula eucariotă există organite simple prevăzute cu membrană, iar ribozomii au dimensiuni mai mari decât la procariote.

Pentru sistematizarea microorganismelor, se studiază întotdeauna caracterele morfologice, fiziologice, biochimice ş.a. ale culturii pure, cultură ce rezultă prin înmulţire dintr-o singură celulă (sau unitate formatoare de colonie), în mediu nutritiv steril şi deci cuprinde celule aparţinând unei singure specii (Grinevici A.G., 1986).

În clasificări, pe bază de criterii morfologice şi fiziologice riguroase, stabilite de la general la particular, principalele grupe de microorganisme componente ale regnurilor citate, sunt clasate în: diviziuni, clase şi subclase, ordine familii, triburi, genuri şi specii.

La baza tuturor clasificărilor este situată specia, produs al evoluţiei materiei vii, ca rezultat al adaptării la condiţiile existente ale mediului ambiant.

Principalele unităţi taxonomice pot fi definite astfel:

Specia - corespunde populaţiei de indivizi cu numeroase proprietăţi comune, denumite caractere cu specificitate de specie, care le disting de alte specii. Microorganismele aparţinând unei specii au aceeaşi origine, sunt adaptate la un anumit mediu de viaţă, au metabolism asemănător şi sunt apropiate între ele prin caractere genetice. Specia la microorganisme este denumită în două cuvinte, primul fiind numele genului, care include mai multe specii. Cel de al doilea cuvânt, scris întotdeauna cu literă mică, de obicei defineşte un

caracter specific. În cadrul speciei se diferențiază prin caractere distinctive limitate, subspecii, tulpini, varietăți.

Tulpina - este reprezentată de un grup de indivizi care posedă în comun caractere cu specificitate de tulpină prin care se disting de alți indivizi ai aceleiași specii. În colecții de culturi microbiene se păstrează tulpini de referință, sau tulpina tip a speciei, la care se raportează caracterele microorganismelor izolate din natură, în vederea identificării. În literatura de specialitate, în traduceri se mai întâlnesc denumirile de sușe (din limba franceză) și rasă (din limba rusă), cu semnificații similare. De asemenea este denumită **"izolat"** orice cultură pură obținută prin separare dintr-o populație heterogenă, întâlnită în medii naturale, până când este identificată ca specie și gen.

Genul - cuprinde una sau mai multe specii pe baza unor caractere comune, specifice de gen. Denumirea genului este latinizată.

Trib - grup de genuri înrudite.

Familie - grup de triburi sau genuri înrudite.

Ordin - grup de familii înrudite.

Clasa - gruparea ordinelor înrudite.

Tabel 1.
Sistematica generală a microorganismelor

Supraregn Caractere generale	Regn	Ramură (diviziune)	Grupe importante
I. EUCARIOTAE ● Nucleu definit, separat prin membrană de citozol ● ADN+histone în cromozomi ● ADN în mitocondrii și plasmide	MICETALIA (MYCOTA)	EUMYCOTA (FUNGI)	Micromicete (ciuperci microscopice); 1. Monocelulare: drojdii, mucegaiuri inferioare 2. Pluricelulare: mucegaiuri superioare (cu miceliu septat) Macromicete - ciuperci comestibile
	PLANTAE	ALGE	Alge verzi-albastre - surse neconvenționale de proteine
	ANIMALIA	PROTOZOA	Monocelulare, din care patogene:Giardia, Trichomonas, Plasmodium
II. PROCARIOTAE ● ADN în citozol	BACTERIA	SCOTOBACTERIA	Bacterii, actinomicete, Mycoplasme (bacterii fără perete celular, patogene)
● lipsă organite libere		PHOTOBACTERIA	Bacterii fotosintetizante
III. VIRA ● particule infecțioase acelulare	PROTOVIRA	RIBOVIRA	- Virusuri ce conțin ARN
	EUVIRA	DEOXYVIRA	- Virusuri ce conțin ADN - Prioni - patogeni transmisibili, agenți ai îmbolnăvirilor degenerative ale sistemului nervos central.

(Dicționar enciclopedic Biologie, 1989)

CAPITOLUL 3
CARACTERIZAREA PRINCIPALELOR GRUPE DE MICROORGANISME CU IMPORTANŢA ÎN INDUSTRIA ALIMENTARĂ

3.1. DROJDII (LEVURI)

Drojdiile reprezintă un grup taxonomic complex şi heterogen de microorganisme monocelulare de tip eucariot, care se înmulţesc prin înmugurire, ca formă generală de reproducere şi în mod particular prin ascospori formaţi pe cale asexuată şi sexuat (în urma proceselor de conjugare între celule).

Istoric. Denumirea de "drojdie" semnifică, în general, sedimentul care se formează după ce a avut loc fermentaţia alcoolică a musturilor dulci. Sinonim, denumirea de *levuri* provine de la verbul „lever" (L. franceză - a ridica) ce sugerează creşterea în volum a aluatului la fabricarea pâinii. Cunoscute din timpuri străvechi pentru activitatea lor fermentativă, drojdiile sunt studiate de Louis Pasteur (1863), studiu continuat de microbiologii: Meyen, Rees şi Hansen care realizează o primă clasificare a drojdiilor în 1896, completată de Guillermond în 1928. Drojdiile pot fi privite ca fungi monocelulari spre deosebire de mucegaiuri care sunt fungi filamentoşi pluricelulari. Delimitarea nu este precisă deoarece unele drojdii pot forma miceliu.

Un studiu taxonomic de referinţă aparţine lui Lodder (1952, 1970) şi mai recent, lui Kreger van Rij (1984). În această clarificare genul *Torulopsis* este transferat în genul Candida şi unele specii ale genului *Saccharomyces* au fost transferate în genul *Torulaspora* şi genul *Zygosaccharomyces*. Deoarece starea perfectă, teleomorfă, este în prezent cunoscută, s-au făcut modificările corespunzătoare în clasificările actualizate, încât de multe ori e dificilă referirea la denumirile anterioare.

Importanţă şi rol. Având drept caracteristică principală capacitatea de a produce fermentarea glucidelor simple în anaerobioză cu formare de alcool etilic şi dioxid de carbon, drojdiile fermentative sunt utilizate industrial în biotehnologii alimentare la fabricarea spirtului de fermentaţie, a vinului, berii şi pâinii. Drojdiile au o compoziţie chimică valoroasă şi după cultivare în condiţii de aerare şi prelucrare sunt utilizate ca sursă de proteine în alimentaţia umană, cu denumirea de SCP (single cell protein - proteine din monocelulare)

sau în alimentaţia animalelor, deoarece pe lângă 45-55% proteină brută/la 100 g s.u., aduc în raţie aminoacizi (lizină ş.a.) şi vitamine ale grupului B (tiamină şi riboflavină).

În microbiologia industrială, din biomasă de drojdie se obţin; extracte (plasmolizate, autolizate), folosite ca aditivi alimentari sau pentru îmbogăţirea în substanţe azotate a mediilor de cultură destinate fermentaţiilor. Cu ajutorul drojdiilor se pot obţine avantajos în condiţii industriale, vitamine hidrosolubile: B_1, B_2, PP, ergosterol; enzime; ß-fructofuranozidaza şi ß-galactozidaza, iar prin hibridizări şi inginerie genetică, din mutanţi ai speciei *Saccharomyces cerevisiae*, s-a obţinut interferonul - substanţă cu efect antiviral şi citostatic.

Răspândire în natură. Drojdiile au o largă răspândire în mediul ambiant, fiind întâlnite în toate habitaturile naturale. În sol, celulele de drojdie se întâlnesc în straturile superficiale până la adâncimi de aproximativ 30 cm, în concentraţii de 10^2-$2 \cdot 10^5$/g. Cantitatea creşte în solurile viilor şi grădinilor, ca urmare a îmbogăţirii solului în substanţe nutritive furnizate de fructele care cad la sol şi suferă lent putrezirea. Din sol, prin acţiunea unor factori (fizici, mecanici, biologici), microorganismele se pot afla temporar în aer şi să se răspândească la distanţe mari; din sol şi aer drojdiile pot ajunge în ape şi unele specii pot fi întâlnite chiar la adâncimi de 4000 m.

În mod permanent, drojdiile se află în microbiota epifită a plantelor (flori, fructe, frunze, rădăcini); răspândirea drojdiilor este favorizată de insecte care odată cu nectarul/sucul preiau şi celulele de drojdii. Se consideră că unele drojdii pot hiberna în tractul digestiv al insectelor, care beneficiază de vitaminele eliberate de celule şi primăvara, odată cu primul lor zbor, drojdiile sunt eliminate şi răspândite în mediul ambiant. În organismul animal, drojdiile sunt prezente în biocenoza intestinală şi se elimină natural prin produse de dejecţie; în cantităţi mai reduse se întâlnesc în cavitatea bucală şi pe piele.

Un grup restrâns de drojdii sunt patogene şi dau îmbolnăviri la om şi animale. Dintre acestea mai importante sunt: *Candida albicans* - agent al candidozelor cutaneo-mucoase şi viscerale, *Cryptococcus neoformans* - agent al îmbolnăvirii pulmonului şi sistemului nervos central şi *Malassezia furfur* - agent al micozei pielii.

Caractere morfologice generale

Celula de drojdie are în mod obişnuit formă sferică, ovală sau cilindrică, cu dimensiuni medii de 4-14μm. Unele tulpini sunt monomorfe, deci prezintă în cultura pură celule de un singur tip morfologic; altele sunt dimorfe sau polimorfe.

Forma şi dimensiunea celulelor este un caracter de gen şi specie şi acestea pot fi influenţate de starea fiziologică şi condiţiile de cultivare. Suprafaţa celulei poate avea valoarea medie de 118μm^2 şi o masă de $1,3.10^{-10}$ g.

Dintre formele caracteristice unor genuri cu importanță în industria alimentară, se menționează:

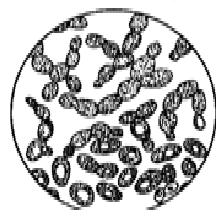
Forma ovală (elipsoidală) specifică drojdiilor fermentative ce aparțin genului *Saccharomyces*.

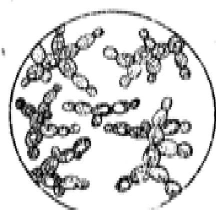
Forma sferică - predomină la drojdii din genul *Torulopsis*

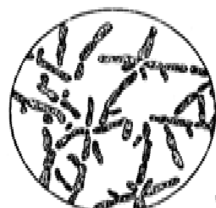
Forma apiculată (de lămâie) la genurile *Kloeckera* și *Hanseniaspora*.

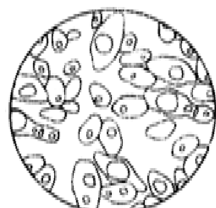
Forma cilindrică (alungită) specifică drojdiilor din g. *Candida*

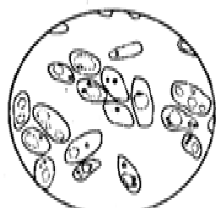
Forma de sticlă - la drojdii din genul *Saccharomycodes*


Saccharomyces cerevisiae

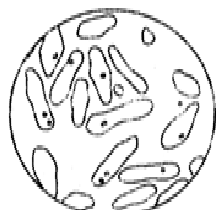

Sacch. cerev. ellipsoideus


Candida mycoderma


Kloeckera apiculata


Torulopsis holmii


Brettanomyces intermedius


Saccharomycodes ludwigii

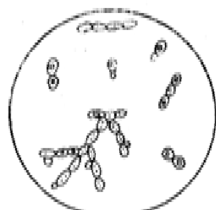

Saccharomycopsis fibuligera

Fig. 1. Caractere microscopice ale unor genuri/specii de drojdii cu importanță practică

Când celulele de drojdie sunt inoculate în medii nutritive lichide, de exemplu în must de malț steril, în cazul drojdiilor fermentative, ca rezultat al fermentării anaerobe a zahărului se formează alcool etilic și dioxid de carbon și se produce tulburarea mediului, formarea de spumă (ca rezultat al antrenării celulelor de către dioxidul de carbon format), apoi are loc depunerea lor în sediment și limpezirea supernatantului. În cazul drojdiilor oxidative (g. *Pichia, Candida* ș.a.), la suprafața lichidului se formează un voal cutat, alb - crem care se destramă ușor, dând tulburare și sediment.

Prin cultivarrea celulelor de drojdie pe medii nutritive solide sau solidificate (de exemplu: must de malț cu agar), în cazul în care la suprafață se află o celulă unică, rezultă prin înmugurire succesivă, o biomasă de celule de același fel, respectiv o colonie cu caractere morfologice specifice. Coloniile de drojdii au diametrul între 0,2-2 cm cu aspect cremos, lucioase sau mate, de culoare în general alb-crem; drojdii din g *Rhodotorula și Sporobolomyces* formează colonii colorate în roșu-portocaliu datorită pigmenților carotenoizi sintetizați intracelular.

Coloniile, în secțiune pot avea un profil lenticular, semicircular sau triunghiular cu perimetrul circular, umbonat, cu margini ondulate. Caracterele morfocoloniale reprezintă criterii valoroase pentru identificarea drojdiilor.

Structura celulei de drojdie

Celula eurocariotă de drojdie se diferențiază puțin de celula animală; fața de celula vegetală se diferențiază prin absența cloroplastelor și a învelișului celulozic. Unele structuri subcelulare ale drojdiei se pot vizualiza cu ajutorul microscopului fotonic (nucleu, mitocondrii, vacuole, perete celular, citosol) în timp ce ultrastructurile (membrana citoplasmatică, reticul endoplasmatic, aparat Golgi ș.a.) au putut fi observate doar cu microscopul electronic (x 20.000).

Cunoașterea organizării arhitecturale complexe a celulei de drojdie este utilă pentru înțelegerea potențialului funcțional al diferitelor componente.

Învelișurile celulare: peretele celular și plasmalema sunt structuri ce limitează celula și intervin în toate procesele biologice fundamentale care se desfășoară la nivel celular.

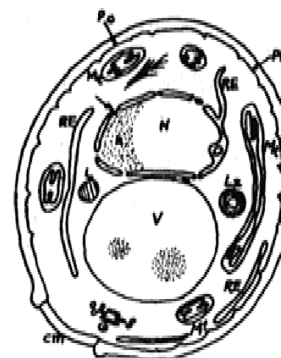


Fig. 2. Organizarea internă a celulei de drojdie

cm - cicatrice mugurală; G - corp Golgi; L - incluziuni lipidice; Lz - lizozomi; Mt - mitocondrie; N - nucleu; n - nucleol; Pc - perete celular; Pl - plasmalemă; RE - reticul endoplasmic; V - vacuolă

Peretele celular are o grosime de aproximativ 25 nm şi poate să reprezinte o pondere de 5-15% din biomasa uscată a drojdiei.

Din punct de vedere structural, peretele celular are aspect laminar şi este alcătuit din 2-3 straturi.

Stratul extern are o suprafaţă rugoasă şi în anumite zone prezintă aşa numitele cicatrice mugurale (adică locul de desprindere a celulelor rezultate prin înmugurire). În componenţa stratului extern predomină mananul - poliglucid format din lanţuri lungi de radicali de manoză legată prin legături α1-2, α1-6, cuplat prin legături covalente şi radicali fosfat de molcule de proteine, formând complexe macromoleculare de manan - proteine. Prezenţa fosfomananilor imprimă stratului extern o sarcină electrică negativă, datorită grupărilor fosfat. La rândul său proteina din peretele celular este o sursă de grupe carboxil încărcate negativ şi grupe de aminoacizi încărcate pozitiv. Grupele încărcate negativ din structura peretelui celular au un rol important in stabilitatea dispersiilor de drojdii şi în comportarea celulelor în timpul fermentaţiei (Berry, 1982). La nivelul cicatricei s-a pus în evidenţă o cantitate mai mare de chitină (N-acetilglucozamină) care împreună cu microfibrile de β glucan alcătuieşte un inel de bordură la locul de desprindere a celulei nou formate.

Stratul intern are o suprafaţă ornamentată cu riduri proeminente formate din fibrile constituite din molecule liniare de β glucan, poliglucid în care radicalii de glucoză sunt legaţi prin legături β1-3, β1-6. Glucanul formează complexe cu proteine şi asigură rigiditatea sau elasticitatea peretelui celular.

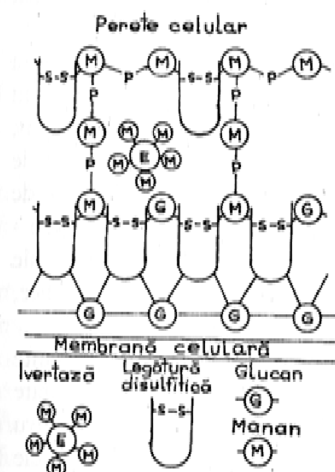


Fig. 3. Model pentru peretele celular al drojdiei (Kidby şi Davies)

Din analiza chimică a peretelui celular rezultă că 80% din substanţa uscată a acestuia este alcătuită din β-glucani şi α-manani, restul fiind reprezentate de proteine, chitină şi lipide.

La nivelul peretelui celular sunt localizate şi enzime (invertaza, fosfataza, endoglucanaze, permeaze) implicate în biosinteza compuşilor peretelui celular şi în procese de transfer a substanţelor.

Peretele celular are un rol esenţial în asigurarea formei celulei şi de protecţie faţă de factorii mediului ambiant. În cooperare cu plasmalema, participă la creşterea şi reproducerea celulară, în biosinteză şi catabolism.

Prin îndepărtarea peretelui celular pe cale enzimatică, se obţin protoplaştii folosiţi

în ingineria genetică, pentru obţinerea prin fuziune a hibrizilor cu importanţă practică. Prin amplasarea protoplaştilor pe mediu nutritiv în timp de 8-12 ore are loc regenerarea peretelui celular.

În funcţie de structura peretelui celular, drojdiile fermentative dobândesc proprietăţi tehnologice importante cum ar fi capacitatea de floculare (de agregare a celulelor în mustul fermentat) sau pulverulenţa (proprietatea de a rămâne suspendate ca celule izolate în lichidul de fermentaţie, cu o depunere lentă în sediment).

Plasmalema (membrana citoplasmatică) reprezintă un strat lamelar cu o grosime de crica 8-9 nm, care delimitează protoplastul la exterior. La celulele tinere apare ca un strat omogen, în timp ce la celulele mature în membrană se evidenţiază învaginări - similare unor şanţuri care îi măresc mult suprafaţa; la microscopul electronic se observă şi câmpuri paracristaline agregate în arii hexagonale.

Plasmalema este o structură de natură lipoproteică în care lipidele reprezintă 23-30%, iar proteinele 30-33% din masa nativă a membranei. În fracţia lipidică predomină fosfolipidele care împreună cu sterolii şi acizii graşi nesaturaţi au un rol esenţial în procese de permeabilitate. Lipidele, cu rol de solvent hidrofobic, permit accesul în celulă al unor substanţe utile (aminoacizi nepolari, vitamine). Proteinele plasmatice sunt glicoproteine ce au o mare mobilitate în plasmalemă şi sub formă de molecule sau complexe moleculare îndeplinesc funcţii de recepţie şi transport; Proteinele solubile în apă, cu grupări polare, pot fixa sarcini electrice, încât prin sorbţie şi schimb ionic este reglat transferul de Na^{+}, K^{+}, Ca^{2+}.

Plasmalema este sediul complexelor multienzimatice cu rol în: biosinteza poliglucidelor din peretele celular (glucansintetaze şi chitinsintetaze), în glicoliză, fosforilare oxidativă (oxidoreductaze, citocromi, reductaze), respectiv, în principalele căi metabolice ale celulei vii. Conform modelului stabilit de Robertson, plasmalema prezintă două straturi lipidice în care molelulele de lipide sunt orientate cu partea hidrofobă spre interior şi cu cea hidrofilă - polară spre periferie şi sunt delimitate în ambele părţi de macromolecule proteice; particule globulare proteice se pot evidenţia şi între straturile lipidice, modificându-şi poziţia în funcţie de starea fiziologică a celulei.

Plasmalema este o structură dinamică unde se realizează importante funcţii ale celulei vii. În primul rând este o barieră osmotică cu permeabilitate selectivă ce reglează transferul de substanţe nutritive necesare în celulă pentru a fi metabolizate, precum şi eliminarea de cataboliţi, iar prin sistemele enzimatice active la acest nivel, intervine în reglarea procesului de creştere şi înmulţire.

Citoplasma este constituită din citosol şi din organite citoplasmatice care sunt dispersate în el. Citoplasma reprezintă mai mult de jumătare din

volumul total al celulei și conține de asemenea o rețea de proteine fibroase care formează citoscheletul ce îi asigură celulei forma și rigiditatea. **Hialoplasma** sau matricea citoplasmatică este substanța fundamentală a citoplasmei, componentă structural funcțională prezentă în toate celulele vii, localizată în spațiul celular în afara compartimentelor delimitate de membranele intracelulare. Ea este formată dintr-o fracție solubilă (citosol), citoschelet și o rețea de filamente (rețea microtrabeculară) care interconectează elemente de citoschelet și organitele celulare în citoplasmă (Voiculeț, 1997).

Citosolul este un sistem coloidal cu un conținut de 75-85% apă, în care substanțele componente se află sub formă de sol sau gel, formând micele coloidale. Dintre substanțele organice predomină proteinele cu rol structural sau catalitic, lipide cu rol plastic și glucide cu rol energetic. În compoziia chimică a citosolului intră și acizii nucleici, respectiv ARN (mesager, de transfer și ribozomal) cu rol în biosinteza proteinelor celulare, ARN_k (denumit killer) implicat în sinteza de proteine cu acțiune toxică pentru alte celule sensibile și ADN-extracromozomial component al plasmidelor citoplasmatice. În citosol, în anumite faze ale creșterii celulare, se pot acumula substanțe în exces sub forma unor **incluziuni de rezervă** și anume:

•Granule de glicogen, se prezintă sub forma unor corpusculi sferici și reprezintă principala substanța de rezervă a celulei; este metabolizat atunci când celula este în stare de înfometare. Se pot evidenția prin suspendarea celulelor de drojdie în soluție de Lugol, când glicogenul în prezența iodului se colorează în brun-roșcat.

• Sferozomii (oleiozomii) reprezintă incluziuni lipidice acumulate în faza staționară de creștere celulară delimitate de o membrană simplă, ce conțin fosfolipide și acizi grași nesaturați ce pot fi metabolizați în condiții de malnutriție, după ce se produce liza enzimatică a membranei.

În ultrasecțiuni ale citosolului a fost pusă în evidență o rețea tridimensională de natură proteică alcătuind un citoschelet cu rol în controlul formei celulei de drojdie.

Dintre **organitele celulare** cu care citosolul interacționează în mod permanent formând o unitate morfofuncțională, fac parte următoarele: **nucleul, mitocondrii, aparatul Golgi, sistemul vacuolar**. Sunt incluse în categoria organitelor celulare structuri subcelulare limitate de membrane cu rol unic în creșterea și metabolismul celulei; fiecare conține o colecție de enzime în interior sau cuplate cu membrane, care catalizează reacțiile chimice necesare pentru funcționarea acestora (Darnel, 199).

Nucleul reprezintă spațiul genetic în care are loc stocarea, replicarea și transmiterea informației celulare. Are o formă sferică sau ovală, de obicei cu o poziție excentrică în citosol și prezintă o anvelopă nucleară în care s-au evidențiat pori care asigură legătura dintre nucleu și citosol. În exterior membrana se

continuă cu reticulul endoplasmatic, iar în interior se află nucleoplasma - mediul în care sunt înglobate nucleolul, cromatina (cromonemata) și aparatul mitotic (Anghel, 1989).

În nucleoplasmă pot fi observate zone cu o înaltă concentrare de ADN, adesea legate de membrana internă a nucleului. ADN-ul nuclear constă din molecule de ADN dublu catenar, libere sau predominant aflate în interacțiune cu proteine bazice cu sarcină pozitivă (histone), alcătuind cromatina.

În timpul diviziunii celulare ADN-ul nuclear se împarte în 2 sau mai mulți cromozomi în funcție de specie. Fiecare cromozom conține o singură moleculă de ADN cuplată cu 5 seturi de histone (H1-S) și are o lungime de $1,5 \cdot 10^5$-$3 \cdot 10^6$ perechi de baze. În faza de reproducere cromozomii au o structură duplicată în două cromatide surori care sunt separate de-a lungul lor, cu excepția unui punct de atașare-centromer; capetele cromatidelor sunt denumite telomeri și mai prezintă secvențe de replicare.

Nucleolul constă dintr-un miez denumit core, alcătuit din histone in formă de disc pe care sunt înfășurate segmente de ADN, formând aranjamente helicoidale sau solenoide. În nucleol sunt sintetizate proteine ribozomale și ARN-ribozomal care apoi trec prin porii nucleari, în citosol. În funcție de caracterele genetice ale speciei de drojdie, numărul de cromozomi nu depășește valori de 8-18 (Konovalov, 1980). În timp ce *Saccharomyces cerevisiae* are 17 cromozomi, la specii ale genului *Hansenula* au fost identificați 4. Unele drojdii sunt obligatoriu haploide, de exemplu drojdiile din g. *Candida, g. Torulopsis, g. Rhodotorula* în timp ce alte genuri (exemplu g. *Sacharomyces* ș.a.) pot prezenta faza haploidă (1n) în faza de ascospori și faza diploidă (2n), în faza vegetativă de reproducere.

Mitocondrii sunt organite mari care pot ocupa până la 25% din volumul citosolului, în număr variabil de 10-50/celulă, într-o continuă metamorfoză, încât în unele faze fiziologice pot forma o mitocondrie unică, ramificată denumită condriom. În structura mitocondriei se distinge un înveliș de natură fosfolipidică format din două membrane diferite; externă și internă, care delimitează două compartimente și anume spațiul intermembranar și compartimentul central. Acesta prezintă un matrix cu pliuri/criste de natură liproproteică pe care sunt localizate enzime de catabolism, implicate în ciclul Krebs și

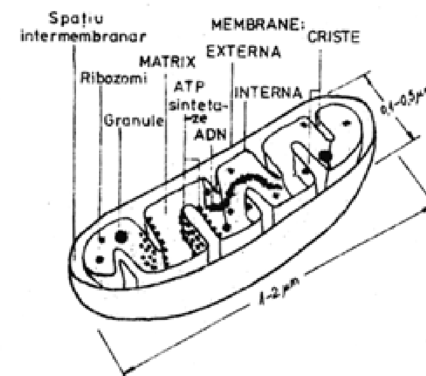


Fig. 4. Secțiune longitudinală în mitocondrie

în β-oxidarea acizilor grași, în fosforilarea oxidativă, în sinteza de ATP pentru necesitățile energetice ale celulei.

Sistemul vacuolar poate fi alcătuit dintr-un vacuom central prevăzut cu o membrană - tonoplasma, vizibil la microscop în faza staționară de creștere a celulei, sau din mai multe vacuole mici, în faza de creștere exponențială. Vacuolele conțin o cantitate mare de apă în care se solubilizează aminoacizi, proteine, enzime, purine, polifosfați. Vacuolele îndeplinesc funcții importante în reglarea presiunii, în menținerea stabilității chimice a citosolului, în hidroliza enzimatică a unor proteine și globule lipidice, iar produșii rezultați trec în citosol unde sunt metabolizați intracelular.

Reticulul endoplasmatic face legătura între nucleu și vacuom și reprezintă o rețea de vezicule - cisterne interconectate, caracterizate printr-o mare plasticitate morfologică. Reticulul endoplasmatic este sediul unor complexe enzimatice (citocromoxidaza, NAD^+, enzime ale lanțului transportor de electroni), și are rol în biogeneza sferozomilor, vacuolelor, corpilor Golgi; participă la expansiunea învelișului nuclear și a plasmalemei în diferite etape de dezvoltare ale celulei.

Aparatul Golgi este un sistem de endomembrane, alcătuit din unități funcționale - dictiozomi, care face legătura între reticulul endoplasmatic și plasmalemă. Veziculele Golgi sunt privite adesea ca aparatul de sortare și dirijare a proteinelor și componentelor membranare spre locul lor de destinație; au rol în expansiunea peretelui celular.

Ribozomii sunt particule nucleoproteice implicate în sinteza proteinelor celulare răspândiți în citosol - citoribozomi, liberi sau în asociații de 5-6 polizomi. Au în structură ARN-ribozomal și proteine; ARN_r este implicat în procese de transcripție a informației genetice pentru biosinteza proteinelor/enzimelor, necesare celulei.

Lizozomii sunt structuri veziculare bogate în enzime: fosfataze, proteaze, lipaze ș.a., active la pH=5 cu rol în digestia unor compuși ai celulei vii, care nu mai funcționează eficient; în exteriorul lizozomului, în citosol, enzimele nu sunt active deoarece pH-ul este de 7,3. Când sub acțiunea unor factori, de exemplu în starea de înfometare, în absența apei care să asigure transportul în exteriorul celulei a cataboliților formați, pH-ul în citosol scade, sunt activizate enzimele din lizozom și celula moare prin autoliză.

Peroxizomii sunt structuri sferice cu membrană simplă și o matrice pe care sunt localizate oxidaze, cu rol în adaptarea celulei de drojdie la condiții aerobe și intervin în ciclul glioxilat, în degradarea acizilor grași, a aminoacizilor (de ex. metionina) și a apei oxigenate.

Caractere fiziologice generale ale drojdiilor

O proprietate importantă a unor drojdii cu utilizări în industria alimentară este aceea de a fermenta în condiții de anaerobioză, glucide (hexoze, diglucide, triglucide) cu formare de alcool etilic și dioxid de carbon și produse secundare, care dau aroma caracteristică produselor fermentate. În condiții de aerobioză, drojdiile asimilează glucidele transformându-le prin respirație la CO_2 și H_2O, iar energia eliberată favorizează creșterea și înmulțirea celulelor.

În raport cu temperatura, majoritatea drojdiilor industriale sunt mezofile (temperatura optimă 28-32°C); există și drojdii adaptate care sunt active la temperaturi de refrigerare, sau drojdii termofile active la 35-38°C.

Drojdiile se dezvoltă bine într-un domeniu larg de pH, cu valori limită între 2,5-8,5 și pH optim la 5,5.

Celulele de drojdie, ca și alte celule, reacționează activ la presiunea osmotică dată de concentrația substanțelor dizolvate în mediul în care se află suspendate. Dacă mediul este hipotonic, cu o concentrație a substanțelor dizolvate mai mică decât concentrația intracelulară, apa va pătrunde în celula care își mărește volumul și dacă se prelungește această stare de **turgescență**, celula suferă deteriorări fizice ireversibile. În mediul hipertonic, când concentrația mediului este superioară concentrației intracelulare, apa din celulă difuzează în exterior pentru a asigura izotonia iar celula trece în starea de **plasmoliză**. Există și un grup adaptat de drojdii osmotolerante din genul *Zygosaccharomyces*, care nu suferă plasmoliza în siropuri de zahăr cu concentrații de 40-60% și genul *Debaryomyces*, tolerante la concentrații de sare (25%).

În condiții naturale celulele de drojdii se pot întâlni ocazional în diferite stări:

- starea fiziologică activă în care celulele cresc și se înmulțesc,
- starea de anabioză determinată de reducerea cantității de apă liberă din interiorul celulei, în care celula se menține în viață în schimb activitatea enzimatică este redusă la minimum.
- starea de autoliză, când în condiții nefavorabile are loc o solubilizare a compușilor sub acțiunea enzimelor proprii (în special proteaze), care conduce la moartea fiziologică a celulei.

Reproducerea drojdiilor

Forma generală de reproducere a drojdiilor este înmugurirea vegetativă (calea asexuată) care are la bază un proces simplificat de **mitoză**, când din celula mamă se formează noua celulă, identică din punct de vedere genetic.

Unele drojdii au capacitatea de a se înmulți nu numai prin înmugurire, ci și prin spori; sporularea este condiționată genetic, are loc în anumite condiții de mediu și are la bază procesul de **meioză**. Reproducerea prin sporulare la drojdii poate avea loc pe cale asexuată în celula vegetativă sau pe cale sexuată prin procese de copulare (conjugare) între celule diferențiate și este un criteriu important ce stă la baza clasificării drojdiilor.

Tabel 2
Împărțirea drojdiilor după modul de reproducere

Grup drojdii	Apartenența în clasificare (subdiv.)	Mod de reproducere		
		Înmugurire vegetativă	Sporulare/Spori	
			Asexuat	Sexuat
1. Drojdii ascogene (perfecte)	Ascomycotina	+	+ (ascospori)	+ (ascospori)
	Bazidiomycotina	+	-	+ (teleutospori)
2. Drojdii anascogene (false)	Deuteromycotina	+	+ (balistospori)	-

(Babieva, 979)

Reproducere prin înmugurire. Pe cale vegetativă (asexuat) drojdiile se pot înmulți prin înmugurire propriu-zisă, caracteristică majorității lor și prin sciziune, în urma formării unui perete despărțitor, caracteristică genurilor *Schizosaccharomyces și Saccharomycopsis*

Înmugurirea are loc în condiții optime, când drojdiile se află în mediu cu o concentrație de glucide simple de 2-5%, substanțe cu azot asimilabile, săruri minerale și factori de creștere; pH-ul optim pentru înmulțire este în domeniul acid 4,5-5,5 iar temperatura optimă la valori între 25-32°C.

O condiție necesară pentru înmugurire este aerarea corespunzătoare a mediului, deoarece în prezența oxigenului din aer are loc asimilarea eficientă a nutrienților cu recuperarea energiei potențiale a acestora, energie folosită de celula în creștere pentru procese de biosinteză, consumatoare de energie. În acest condiții, în prima etapă celula de drojdie crește în dimensiuni în urma măririi coordonate a componenților intracelulari; creșterea în volum fiind mai rapidă decât a suprafeței învelișurilor celulare, la un anumit stadiu se declanșează

înmugurirea. Astfel într-o zonă (placă) a peretelui celular are loc o înmuie enzimatică a peretelui și apare o protuberanță - **mugurele**, care treptat creș în dimensiuni. Între celula parentală și mugure se perfectează un canal - **dive ticulum** prin care se transferă în celula nou formată, material nuclear citoplasmatic, prin cariokineză și citokineză. Când celula fiică va conține toa componentele necesare unei vieți independente, la nivelul canalului se formea un perete inelar cu o concentrație ridicată în chitină, ce se dezvoltă centripe până când are loc obturarea și separarea.

Celula fiică, cu activitate metabolic independentă poate rămâne atașa de celula mamă formând asociații sau pseudomiceliu, de exemplu la drojd fermentative și oxidative - formatoare de voal. În mod frecvent celula no formată se separă de celula parentală iar la locul de desprindere rămâne vizibi cicatricea mugurală.

În condiții optime de viață o celulă de drojdie poate forma 9 - 43 n celule, apoi celula moare din punct de vedere fiziologic. Celulele diploide p produce 23-59 celule fiice în timp ce celulele haploide 2-33 celule. Pentr drojdiile la care separarea mugurelui are loc prin sciziune, prin înmugurire s pot forma structuri lineare ce alcătuiesc miceliu adevărat.

Prin examinarea ciclului de viață al celulei eucariote, a procesel complexe ce au loc la creștere și reproducere, se disting mai multe faze, în ca se produc importante transformări la nivel subcelular și molecular. Creștere celulei are loc în **interfază** perioada între două diviziuni nucleare, care poate separată în trei părți:

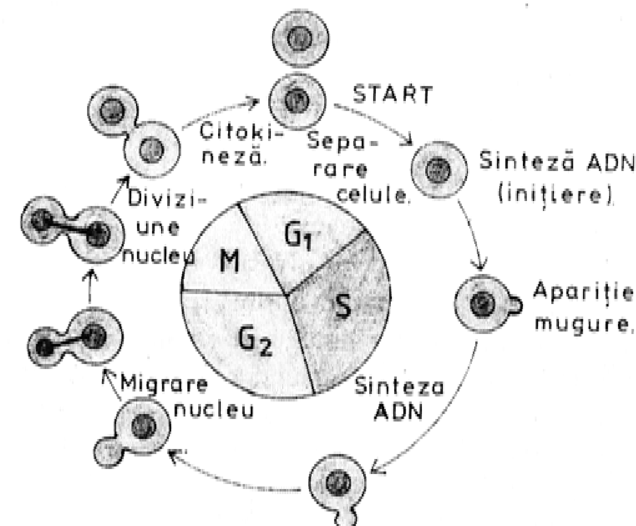


Fig. 5 Fazele creșterii la Saccharomyces cerevisiae

Etapa G1 este timpul în care are loc sinteza activă de ARN, formarea ribozomilor şi a altor constituenţi citoplasmatici care determină creşterea în dimensiuni a celulei.

Etapa S este etapa de sinteză în care are loc replicarea activă a ADN-ului. Sinteza ADN-ului durează aproximativ 30 minute în timp ce înmugurirea, aproximativ 40 minute şi reprezintă 1/4 din ciclul mitotic. Replicarea (duplicarea) materialului genetic la fiecare nouă generaţie de celule, are loc bidirecţional cu separarea de ADN monocatenar pe care apoi se sintetizează copia complementară. Procesul este semiconservativ în sensul că cele două molecule de ADN rezultate vor conţine fiecare câte o catenă veche şi una nouă (complementară).

În ADN-ul drojdiei, cele $5 \cdot 10^5$ perechi de bază în succesiunea lor specifică, alcătuiesc unităţi de transcripţie, gene sau cistroni (secvenţe de ADN necesare pentru a produce un ARN sau un peptid), intercalate de secvenţe simple (pseudogene) şi elemente mobile genetic. Prin transcripţie se formează în nucleu molecule de ARN (pseudogene) şi elemente mobile genetic. Prin transcripţie se formează în nucleu molecule de ARN (mesager, de transfer şi ribozomal) care migrează prin porii membranei nucleare în citoplasmă, unde prin translaţie are loc biosinteza de proteine/enzime, de a căror specificitate depinde majoritatea reacţiilor metabolice.

Replicarea este posibilă prin activarea enzimelor, ADN - polimeraza, ADN - ligaza şi endonucleaze, care sunt sintetizate concomitent cu ADN-ul; procesul durează 1,2 - 2 ore şi are loc înainte de începerea înmuguririi.

Etapa G2 este o perioada în care celula se pregăteşte pentru mitoză.

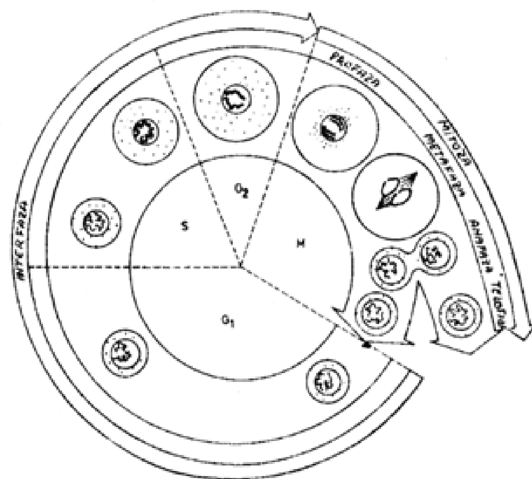


Fig. 6 Ciclul celulei eucariote

Mitoza (diviziunea nucleară) urmează după interfază. Materialul genetic dublat cantitativ în cursul perioadei de sinteză (S) este distribuit egal la cei doi nuclei nou formaţi prin diviziune, astfel încât atât celula mamă cât şi celula fiică rezultată prin înmugurire va cuprinde un set complet de cromozomi (Fig. 7).

Principalele faze ale mitozei sunt:

Profaza. Din cromatină se grupează cromozomii compuşi din două cromatide ataşate în zona centromerului şi structuri specifice alcătuite din microtubuli de acroşare şi proteine denumite SPB (un SPB va migra în mugure), se formează fusul nuclear şi dispare membrana nucleară.

Metafaza. Cromozomii se deplasează spre placa ecuatorială unde centromerul fiecărui cromozom (cu cromatide duble) se ataşează de microtubuli SPB. Sfârşitul metafazei este marcat de decuplarea centromerilor, deci segregarea cromatidelor perechi, care are drept consecinţă dublarea numărului de cromozomi.

Anafaza - etapă în care cromatidele desprinse de centromer migrează spre polii opuşi plăcii ecuatoriale, încât la fiecare pol se va afla câte un set de cromozomi. La sfârşitul anafazei începe citokineza - deci divizarea citosolului celulei parentale pentru a forma noua celulă şi cuprinde un ansamblu de fenomene care conduc la diferenţierea septului ce separă celula mamă de celula mugurală.

Telofaza, etapa finală în care cromozomii devin mai lungi, subţiri, se formează o nouă membrană nucleară, se perfectează citokineza şi are loc separarea celulei nou formate.

În procesul de înmulţire a drojdiei prin mitoză, numărul original de cromozomi se păstrează constant; aceasta înseamnă că dacă celula parentală este diploidă şi celulele rezultate prin înmugurire vor rămâne tot diploide (2n) şi respectiv dintr-o celulă haploidă se vor forma două celule, tot haploide (1n). În funcţie de specie numărul de cromozomi poate varia între 4-18.

Înmulţirea drojdiilor prin înmugurire este un proces cu multiple aplicaţii industriale, în scopul obţinerii cu un randament ridicat a biomasei de celule, la fabricarea drojdiei comprimate, a drojdiilor furajere, a culturilor de drojdii selecţionate folosite drept culturi starter, la fabricarea spirtului, berii, vinului, sau pentru extragerea din biomasă a unor compuşi endogeni valoroşi (vitamine, enzime ş.a.)

Reproducerea prin sporulare. Este un proces particular întâlnit la drojdiile sporogene care au dobândit capacitatea genetică de a forma în anumite condiţii, în medie 2-14 ascospori.

Sporularea are la bază procesul de **meioză** (meion = mai puţin) prin care numărul de cromozomi ai celulei parentale diploide se reduce la jumătate, iar celulele formate primind un singur set de cromozomi sunt haploide.

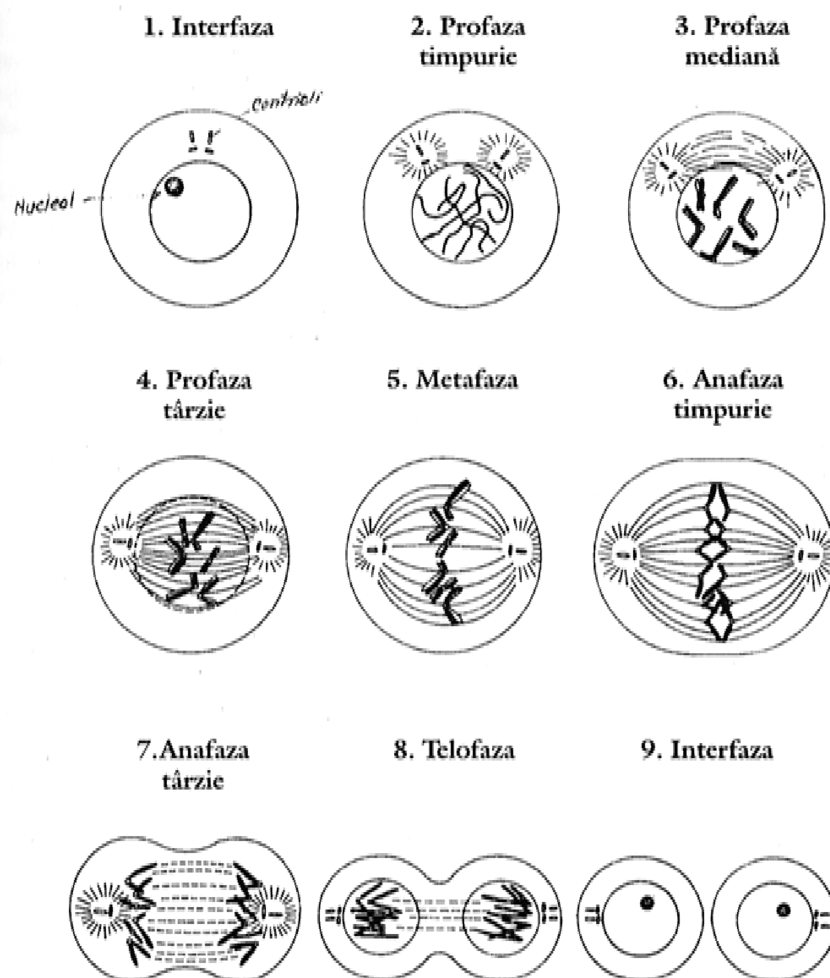


Fig. 7. Mitoza şi citokineza la o celulă tipic eucariotă

Meioza constă în două etape succesive:

Etapa I-a sau diviziunea reducţională. În timpul profazei cromozomii omologi se alătură doi câte doi, formând perechi, astfel încât fiecare pereche are patru cromatide. Odată cu eliberarea lor din nucleu, în metafază aceştia se amplasează în zona ecuatorială a fusului nuclear şi în anafază are loc separarea perechilor şi la polii fusului de diviziune se adună 1/2 din numărul iniţial de cromozomi, formându-se în telofază, 2 celule cu nuclei haploizi.

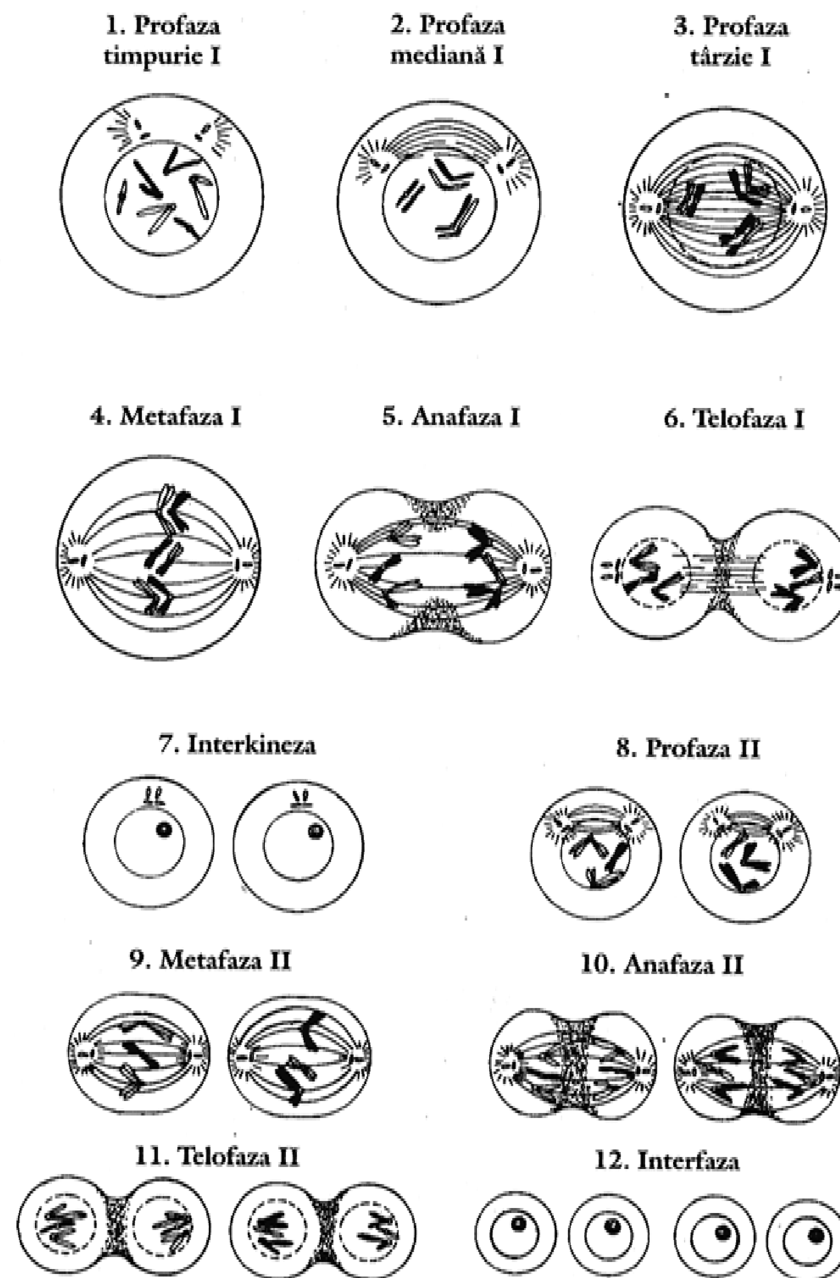


Fig. 8. Meioza la celula tipic eucariotă

Etapa a II-a este similară în succesiunea fazelor cu diviziunea mitotică, prin care cele două celule haploide se divid în urma dublării numărului de cromozomi și a separării lor, încât după completarea meiozei (etapa I și II), celula originală diploidă se transformă în 4 celule haploide.

În cazul drojdiilor ascogene, de exemplu cele aparținând genului *Saccharomyces* sporularea poate fi indusă prin transferul celulelor din must în fermentație pe un bloc de ghips sau pe medii inductive (McClary, Gorodkova). În acest condiții, în celulă prin sporulare asexuată se formează **ascoporii**, al căror număr și caractere morfologice sunt dependente de specie.

Sporularea este inițiată după circa 10 ore de expunere pe mediu de sporulare și este mai intensă după 24-48 ore. În timp, celula generatoare de spori denumită și **ască**, se poate rupe sau să se solubilizeze prin autoliză și ascosporii liberi, în condiții favorabile germinează și formează prin reproducere vegetativă, clone haploide. Ascosporii haploizi pot fi de tip "a" sau "α" în funcție de natura feromonilor specifici; în condiții favorizante, celulele ajunse la maturitate fiziologică denumite și gameți pot să fuzioneze printr-un proces de conjugare pentru a forma din nou celule diploide. Dacă are loc conjugarea între celule de același tip **a/α**, celulele diploide sunt viabile, dar ascosporii formați își pierd această calitate. În fig. 9 se prezintă ciclul de viață al drojdiei exemplificat pentru genul *Saccharomyces*.

Fig. 9. Ciclul de viață a drojdiilor din genul Saccharomyces

Sub formă de ascopori drojdiile rezistă timp îndelungat în sol, în condiții de uscăciune, în schimb termorezistența lor este apropiată cu cea a celulelor vegetative (cu inactivare la 75-85°C).

Capacitatea de sporogeneză a drojdiilor este un criteriu taxonomic important în identificarea speciilor, iar hibrizii rezultați prin conjugare dirijată ocupă un loc important în biotehnologie pentru obținerea de drojdii mutante,.

Clasificarea generală a drojdiilor

Potrivit Codului Internațional de Nomenclatură Botanică tulpinile de drojdii sunt grupate în specii, (se evaluează numărul de drojdii cunoscute între 490-590 de specii), speciile în genuri, iar genurile în subfamilii și familii. În taxonomia drojdiilor specia are două sensuri, unul este de nomenclatură, considerat ca unitate fundamentală în clasificare, care se aplică atât drojdiilor asexuate cât și sexuate, în timp ce celălalt sens se referă la capacitatea membrilor speciei de a intercopula, încât absența interfertilității între specii indică apartenența la alt gen. (Laschance, 1985). Ca și în cazul celorlalte grupe de microorganisme, familiile sunt asamblate în ordine, acestea în clase și clasele în diviziuni.

La baza clasificării drojdiilor stau anumite criterii care iau în considerare:

- Criterii morfologice/fenotipice (formă, structură). Importanța semnelor fenotipice în separarea speciilor de drojdii a început să se diminueze.
- Modul de reproducere sexuată (starea **teleomorfă**) sau asexuată (starea **anamorfă**)
- Caractere fiziologice și particularități biochimice (pentru diferențiere se pot aplica 10-40 teste), mai importante fiind; - fermentarea unor glucide în condiții de semianaerobioză; - dezvoltarea în condiții de aerobioză prin asimilarea unor compuși ca unică sursă de carbon sau de azot, - dezvoltarea în absența surselor endogene de vitamine, creșterea în prezență de 50-60% D-glucoză, sau a 10% NaCl + 5% D-glucoză, - creșterea la 37°C, - dezvoltarea în prezența actidionei, - capacitatea de a hidroliza lipide, uree, de a produce poliglucide, de a forma acizi. (Anghel I., 1989).

În descrierea speciilor standard (sau de referință) se mai determină conținutul de guanină + citozină din ADN-ul celular și prezența coenzimei Q (ubichinona), enzimă transportoare de electroni, componentă a lanțului respirator.

O clasificare de referință este cea propusă de Lodder și Kreger van Rij (1952) care clasifică drojdiile în 38 genuri și 349 de specii de drojdii, iar clasificarea cea mai recentă și cuprinzătoare aparține lui Kreger van Rij, 1984. (60 genuri cu aproximativ 500 de specii). Din această clasificare se vor menționa genuri și specii cu implicații în industria alimentară, în calitatea lor de agenți ai fermentației alcoolice sau de alterare a produselor alimentare.

Tabel 3
Clasificarea generală a drojdiilor

Diviziune, clasa/ordin	Familie/subfamilie	Genuri	Specii importante
Ascomycotina/ Hemiascomycetes	Saccharomycetaceae		
	a. Schizosaccharomycetoidae	Schizosaccharomyces	Schiz. pombé Schiz. acidovorax Schiz. octosporus
	b. Saccharomycetoidae	Debaryomyces	D. hansenii
		Hansenula	H. anomala H. saturnus
		Issatchenkia	I. orientalis
		Kluyveromyces	K. lactis, K. fragilis
		Pichia	P. membranefaciens P. fermentans P. farinosa
		Saccharomyces	Sacch. cerevisiae Sacch. carlsbergensis Sacch. bayanus
		Saccharomycopsis	Saccharomycopsis fibuligera
		Torulaspora	T. delbrueki
		Yarrowia	Y. lipolitica
		Zygosaccharomyces	Z. rouxii
	c. Nadsonioideae	Hanseniaspora Saccharomycodes	H. apiculata Sacch. ludwigii
	d. Lipomycetoideae	Lypomices	
Basidiomycotina/ Ustilaginales	Filobasidiaceae	Fillobasidiella	
Deuteromycotina	Cryptococcaceae	Brettanomyces	B. intermedius
		Candida	C. mycoderma C. utilis C. robusta C. tropicalis
		Kloeckera	K. apiculata K. magna
		Rhodotorula	Rh. glutinis Rh. rubra
		Trichosporon	T. cutaneum
	Sporobolomycetaceae	Sporobolomyces	

Descrierea principalelor caractere de gen și incidența drojdiilor în produse alimentare

Brettanomyces - cuprinde drojdii anascogene de formă oval cilindrică (ogivă) și polimorfism, cu înmugurire terminală. În must de struguri sunt ovale cu dimensiuni (3,3-9,6) (2,5-3,7)μm și treptat se alungesc formând pseudomiceliu. În aerobioză pot să producă prin fermentarea lentă a glucozei, alcool etilic 11-12% alcool, acid acetic, citric, lactic, succinic. Dau alterări ale berii, vinului (tulburare, iz de șoarece), cu formare de esteri și substanțe cu gust amar, a băuturilor nealcoolice, a murăturilor. Sunt inhibate la concentrații mai mari de 100 g SO_2 dm^{-3} (Saenko, 1980).

Candida - este un gen bogat în specii (81), heterogen din punct de vedere morfologic și fiziologic și care a suferit în timp multe modificări omice. *Candida mycoderma (valida)* denumită și floarea vinului se dezvoltă în prezența aerului la suprafața lichidelor slab alcoolice formând un voal caracteristic; prin oxidarea alcoolului la dioxid de carbon și apă are loc deprecierea vinului, berii. Alte specii: *C. utilis, C. robusta, C. tropicalis, C. lypolitica* ș.a., se pot cultiva pe medii obținute prin prelucrarea unor deșeuri ale industriei alimentare, a lemnului și celulozei, obținându-se o biomasă, cu un conținut de 45-55% proteină, folosită în furajarea animalelor. *Candida krusei* intervine în fermentarea boabelor de cacao și cafea.

Drojdii - *Candida kefyri* sunt utile la fabricarea chefirului, iar *C. pseudotropicalis* este frecvent întâlnită în microbiota cărnii tocate de vită. Candida albicans - drojdie facultativ patogenă nu se înmulțește în alimente. Multe forme anamorfe ale genului Candida sunt incluse în genul Kluyveromyces și Pichia.

Cryptococcus este forma anamorfă a genului Filobasidiella. Nu fermentează glucide, pot forma arthrospori și pigmenți colorați în roșu, oranj. Se pot întâlni în microbiota plantelor, fructelor, a peștelui, creveților, a cărnii tocate. Utilizează inozitolul ca unică sursă de carbon (Barnett 1979).

Debaryomyces - cuprinde drojdii de formă oval cilindrice, cu înmulțire multipolară, pot produce pseudomiceliu. *D. hansenii* (Torulaspora hansenii) este halotolerantă și crește în medii cu 24% NaCl, la un indice a_w=0,65. Poate produce mucus la suprafața batoanelor de salam, se dezvoltă la suprafața brânzeturilor, iaurtului și dau alterări ale sucurilor concentrate de portocale.

Hanseniaspora include drojdii cu proprietăți fermentative reduse (5° alcool), cu formă apiculată și înmulțire bipolară. Sunt răspândite în microbiota fructelor citrice, a smochinelor; intervin în fermentarea naturală a boabelor de cacao. *Hanseniaspora apiculata* poate reprezenta până la 90% din microbiota

mustului și își reduce viteza de fermentare la acumularea de 5-7% alcool. Se poate dezvolta în vin fiind responsabilă pentru formarea de acizi volatili, esteri care dau un gust amar, străin vinului. Prin contaminarea vinului folosit la obținerea șampaniei la sticle, *H. apiculata* poate forma un sediment aderent la sticlă și care se îndepărtează greu la degorjare

Issatchenkia - drojdii cu înmulțire multipolară, producătoare de pseudomiceliu. *L. orientalis* este o drojdie oxidativă și poate forma voal la suprafața lichidelor fermentate. Este teleomorf al speciei *Candida krusei*.

Kloeckera cuprinde drojdii de formă apiculată, de lămâie sau amforă, întâlnite în microbiota fructelor dulci. Se dezvoltă în mustul de strug___ în prima etapă a fermentației și activitatea sa este inhibată la creșterea concentrației în alcool peste 4-6°. Ca specii: *K. apiculata, K. magna,* cu forme sexuate în *Hanseniaspora*.

Kluyveromyces - drojdii cu înmulțire multilaterală, pot produce pseudohife și se înmulțesc prin ascospori (1-16/ască) sferici sau reniformi. *K. marxianus* (care include speciile denumite anterior *K. fragilis, K. lactis*) produce ß-galactozidază, fermentează lactoza și poate produce alterări ale brânzeturilor.

Pichia conține 35 de specii; se înmulțesc prin înmugurire multilaterală, pot forma miceliu adevărat (cu arhtrospori) sau pseudohife. Au o slabă activitate fermentativă; *Pichia membranefaciens* - stare teleomoforă a lui *Candida valida*, produce 3°, iar *Pichia fermentans* până la 7,4° alcool. Sunt drojdii peliculare; prin dezvoltare și formare de voal produc deprecierea vinului, a berii. Se pot izola de pe suprafața peștelui și a crevețil(or), din saramura măslinelor conservate și pot produce alterări ale produselor vegetale murate.

Rhodotorula include celule cu formă oval - cilindrică și incluziuni intracelulare refrigerente de natură lipidică. Sunt drojdii oxidative și pot sintetiza pigmenți carotenoizi care imprimă coloniei culoarea roșu - cărămiziu. *Rh. glutinis* și *Rh. mucilaginosa*, predominante pe alimente: pui, pește, creveți, pe suprafața untului, sunt specii psihrotrofe.

Saccharomyces cuprinde 45 de specii cu activitate predominant fermentativă. Se înmulțesc prin înmugurire și sporulare, producând 1-4 ascospori în asce persistente formate direct din celula diploidă. Dintre speciile reprezentative ale genului:

Sacch. cerevistae (Hansen) este o drojdie de fermentație superioară folosită la fabricarea spirtului de fermentație și la obținerea drojdiei de panificație. Celulele au o formă ovală cu dimensiuni medii de (3-7)(4-14)μm. Fermentează în anaerobioză glucoza, fructoza, galactoza, zaharoza, maltoza și doar 1/3 rafinoza. Prin fermentare, optim la 30-32°C, în lichide formează o spumă persistentă. Din biomasa de celule obținută în mediul nutritiv și în condiții de

aerare, prin procedee biotehnologice se pot obține enzime (invertază), vitami
n grupul B, interferon, și altele.

Sacch. carlsbergensis (S. uvarum) are forma ovală și în condiții favorizant raportul între diametre variază de la 2/1 la 1/1. Se diferențiază de *Saccharomyces cerevisiae* prin faptul că fermentează complet rafinoza și prin fermenta formează o spumă puțin stabilă. Temperatura optimă de înmulțire este d 30°C; poate produce fermentația alcoolică la temperaturi scăzute de 3-12°C. Se utilizează industrial la fabricarea berii, iar din drojdia reziduală rezultat după fermentare se pot obține extracte, substanțe de aromă.

Saccharomyces cerevisiae var. ellipsoideus (Sacch. vini) are formă elipsoidal cu dimensiuni (3-6)(6-12)μm, fermentează: glucoza, fructoza, galactoza zaharoza, maltoza și 1/3 din rafinoză. Formează prin fermentare 8,2-16,8% (v/v) alcool etilic. Este sulfitorezistentă și poate produce fermentația alcoolică în medii cu până la 300 mg.dm^{-3}, SO_2 total. În must de struguri în fermentați poate reprezenta 80% din microbiota levuriană. Se poate utiliza în cultur starter în vinificație.

Sacch. bayanus var. oviformis are formă ovoidală cu dimensiuni (4-7) (5-10) μm. Fermentează glucoza, fructoza, zaharoza, maltoza și 1/3-2/3 rafinoză și produce prin fermentație 8,5-18,4% (v/v) alcool etilic. Este sulfitorezistentă. Se utilizează sub formă de culturi pure la fabricarea șampaniei, a vinurilor spumante și a vinurilor speciale (tip Xeres și Jura).

Saccharomycodes cu specia *Saccharomycodes ludwigii* prezintă forme apiculate sau oval alungite cu dimensiuni (3-8)(18-34)μm. Celulele tinere au forma ovală, în timp capătă forma de sticlă. Fermentează fructoza, glucoza, zaharoza, celobioza și 1/3 rafinoza cu formare de 8-12% (v/v) alcool etilic. Este osmotolerantă și acidotolerantă. Prezintă sulfitorezistență ridicată până la 500-600 mg·dm^{-3}. Poate fi agent de alterare a musturilor și sucurilor de fructe și dau tulburarea cidrului, a vinurilor semidulci.

Saccharomycopsis (Endomycopsis) cu specia importantă *Saccharomycopsis fibuligera* prezintă celule ovale cu dimensiuni (4-8)(6-18)μm și forme filamentoase ramificate. Fermentează lent glucoza, zaharoza, maltoza, asimilează amidon, alcool etilic, acid lactic ș.a.; Unele tulpini sunt folosite pentru producerea de glucoamilază sau pentru obținerea de drojdii furajere.

Schizosasccharomyces cuprinde drojdii de formă cilindrică, ovală, și prin reproducere, desprinderea celulei nou formate se face prin sciziune.

Schizosaccharomyces pombé cu dimensiuni (5-7)(3-5)μm este xerofită, rezistentă la conservanți, se dezvoltă rapid la 37°C și poate produce alterarea siropurilor de zahăr. Este agent al fermentării sucului de trestie de zahăr și folosită pentru obținerea romului și a băuturii arak.

Schizosaccharamyces acidovorax poate reduce aciditatea din sucuri de mere prin consum de acid malic. (Nudeli, 1980).

Torulopsis prezintă celule sferice, ovale sau cilindrice. Specii ale genului întâlnite în mustul de struguri (*T. bacillaris, T. stellata*) au putere alcooligenă redusă. Sunt osmotolerante, psihrofile, sulfitorezistente. Pot produce alterări ale laptelui concentrat, a siropurilor, a sucurilor.

Trichosporon, gen întâlnit include la fermentarea naturală a boabelor de cacao și poate fi izolată din carnea tocată, carne de pui. *Trichosporon pullulans* este predominantă și prezintă și activitate lipazică. Unele tulpini sunt folosite la obținerea de SCP.

Zygosaccharomyces cuprinde drojdii haploide cu celule ovale, cu proprietăți fermentative, xerotorelante (osmotolerante). *Z. rouxii* poate crește în medii cu a_w=0,62. Pot produce fermentarea mierii, a siropurilor concentrate de zahăr cu formare de alcool etilic, acid acetic, CO_2 (Jay, 1992) (Dan V. ș.a., 1999)

3.2. MUCEGAIURI (FUNGI FILAMENTOȘI, MICROMICETE)

Mucegaiurile sunt microorganisme de tip eucariot, monocelulare sau pluricelulare, diferențiate din punct de vedere morfologic și care se reproduc prin spori formați numai pe cale asexuată sau pe cale mixtă (asexuată și sexuată).

Caracterele generale ale fungilor care le diferențiază de alte microorganisme. Taxonomic, în grupul fungilor sunt incluse drojdiile care se înmulțesc prin înmugurire sau prin sciziune și fungi tipic filamentoși denumiți mucegaiuri. Există și fungi care pot să prezinte atât forme miceliene cât și forma de drojdii (și invers), ca răspuns la condițiile de mediu. Aceștia sunt considerați fungi dimorfici și includ unii patogeni pentru om, având formă miceliană la 20-25°C și forme de drojdii la 37°C. Toți fungii sunt heterotrofi (chemoorganotrofi) și necesită compuși organici preformați ce pot servi atât ca sursă de energie cât și pentru biosinteza compușilor ce au carbon în moleculă.

Datorită peretelui rigid fungii nu pot îngloba nutrienții încât aceștia absorb nutrienții simpli, solubili ce pot fi obținuți din compuși macromoleculari prin eliberarea de către fungi a enzimelor extracelulare în mediul ambiant. Deci fungii sunt eucariotici, caracteristic miceliení, heterotrofi cu nutriție absorbtivă. Unii fungi atipici sunt grupati în categoria mucegaiurilor producătoare de mucus aceștia nu au pereți celulari și adesea înglobează nutrienții prin fagocitoză fiind similari cu unele protozoare. Structurile reproductive prezintă o variație extraordinară în dimensiuni și forme ale sporilor și în modul în care sunt eliberați de hife. (J.W. Deacon, 1984).

Răspândire și rol. Mucegaiurile sunt răspândite în toate habitaturile naturale, datorită capacității lor deosebite de adaptare la cele mai diferite condiții

ale mediului ambiant. Sunt înzestrate cu un echipament enzimatic compl[ex] ceea ce le permite utilizarea în nutriție a compușilor organici macromoleculari sunt puțin pretențioase și nu necesită cantități mari de apă pentru germinare; se pot dezvolta și în absența factorilor de creștere din mediu.

Fungii saprofiți sunt întâlniți în toate mediile naturale. Un prim habitat îl constituie stratul superficial al solului care le asigură condiții de creștere și supraviețuire. Fungii produc majoritatea enzimelor de depolimerizare ale celulozei și ligninei și astfel asigură reciclarea atât a carbonului cât și a nutrienților minerali pentru creșterea continuă a plantelor. Activitatea lor saprofitică, denunită biodegradare, este esențială în biosferă.

Prin activitatea lor de degradare a materiei organice nevii, mucegaiurile participă la transformarrea unor compuși organici (celuloza, hemiceluloze, substanțe pectice, amidon, lipide) la compuși mai simpli și sunt considerați agenți de putrezire. Mucegaiurile participă astfel la circuitul carbonului în natură și îmbogățesc solul în substanțe cu molecule mici care pot fi folosite de alte microorganisme sau de către plante. În industria alimentară activitatea de biodeteriorare este nedorită deoarece fungii cauzează pierderi prin mucegăirea semințelor, alimentelor, deteriorează pereți ș.a. Ca efect secundar al biodeteriorării este formarea de micotoxine, de către unii fungi, încât alimentele devin inutilizabile.

Din sol, prin intermediul factorilor naturali, sporii de mucegaiuri sunt antrenați pe calea aerului la distanțe foarte mari, ceea ce asigură răspândirea nelimitată de granițe geografice. În aer, mucegaiurile sub formă de spori sau hife vegetative pot supraviețui un timp îndelungat, iar în absența curenților de aer se depun cu o viteză ce poate atinge valori de 3 $cm.sec^{-1}$.

În apă prezența mucegaiurilor este ocazională, apa fiind un mediu prin care se poate face răspândirea sporilor. Creșterea mucegaiurilor în ape este dependentă de conținutul acestora în compuși organici și poate avea loc numai în condiții de aerare.

În afara mucegaiurilor saprofite-agenți ai putrezirii, se întâlnesc mucegaiurile patogene care pot parazita plante, animale, pești și insecte (entomogeni). Mucegaiurile sunt frecvent întâlnite în microbiota plantelor, pe suprafața fructelor și legumelor. Fungii sunt ideal adaptați să paraziteze plantele deoarece prin intermediul hifelor pot pătrunde prin țesutul superficial intact al plantei și să invadeze țesutul intern. Dacă produc îmbolnăviri la plante poartă denumirea de fitopatogeni și sunt responsabili pentru aproximativ 70% din totalul îmbolnăvirilor întâlnite la cereale și legume. (De exemplu *Phytophtora infestans* a produs în 1840, în Irlanda, pierderea recoltei de cartofi ce a avut drept consecință moartea a peste 1 milion de oameni și migrarea unei cifre echivalente în SUA). Unii fungi fitopatogeni se pot dezvolta în asociație cu rădăcinile plantelor formând asociații de tip michoriză. Dintre

mucegaiurile fitopatogene amintim cele care produc boli (mălura, rugina, tăciunele ș.a.) ale plantelor industriale.

La om și animale, mucegaiurile patogene produc comparativ un număr mai redus de îmbolnăviri, sunt dermatofite și se dezvoltă pe piele, unghii, păr. Un număr mic de fungi pot produce îmbolnăviri interne atunci când sporii sunt inhalați (pe care respiratorie) dând micoze și se dezvoltă sub formă de celule de drojdie, formă în care se dispersează mai ușor prin fluide de circulație, în corp (*Aspergillus fumigatus* produce aspergillom pulmonar).

Rolul mucegaiurilor în industrie. În afară de rolul important al mucegaiurilor în natură, în industria alimentară, culturi fungice selecționate se pot folosi la fabricarea brânzeturilor - tip Roqueforti, Camemberti sau la maturarea salamurilor crude.

Cu ajutorul mucegaiurilor, pe cale biotehnologică se pot obține compuși deosebit de valoroși: antibiotice: peniciline cu *P. chrysogenum*, cephalosporine (*Cephalosporium*), griseofulvine (*P. griseofulvum*) acidul fusidic cu *Fusidium coccinenum* și antibiotice active față de bacterii Gram pozitive cu *Mucor ramannianus*, acizi organici (citric, lactic, gluconic, kojic, malic, fumaric), vitamine (B_2, ergosterol-provitamina D_2), enzime (amilaze, proteaze, lipaze, celulaze ș.a.).

Mucegaiurile se mai pot folosi pentru îmbogățirea în proteine a făinurilor vegetale și ca agenți de depoluare a apelor reziduale. Boabe de soia fierte inoculate cu *Rhizopus oligosporus* incubate 24 ore la 30°C dau "tempeh" cu valoare nutritivă ridicată și aromă îmbunătățită (Indonezia). Un alt produs fermentat "gari" care se obține din rădăcini de cassava este folosit de peste 30 milioane de oameni în Nigeria (Cassava, materie primă conține un glicozid cianogenic linamarin extrem de toxic ce poate fi eliminat prin fermentație naturală mixtă în care participă bacterii lactice, *g. Corynebacterium și Geotrichum candidum*).

În tehnologiile moderne se obțin SCP cu fungi din care: *Fusarium graminearum* (firma Rank-Hovis, Mac Dougal in UK) și specii de *Paecilomyces* în procesul Pekilo în Finlanda unde sunt cultivate pe leșii sulfitice și deșeuri din industria hârtiei.

Ca aspect negativ, menționăm degradarea produselor alimentare prin mucegăire, prin modificarea calităților senzoriale și pierderea valorii alimentare prin dezvoltarea mucegaiurilor care pot să elaboreze micotoxine.

Caractere morfologice. Mucegaiurile se răspândesc în natură sub formă de spori rezistenți la uscăciune, formă în care se mențin în stare viabilă ani de zile. Dacă un astfel de spor ajunge pe suprafața unui mediu favorabil pentru creștere, cu o cantitate suficientă de apă liberă care să-i permită absorbția substanțelor nutritive, în primul stadiu care poate să dureze 3-4 ore, are loc absorbția apei și activizarea sistemelor enzimatice, apoi are loc germinarea celulei sporale și formarea tuburilor vegetative numite hife (lt. hypha) sau thal

(thallus). Filamentele individuale sunt înconjurate de un perete care adese conține drept component major chitina. Hifele cresc numai prin vârf și de au o creștere apicală după care se ramifică rezultând miceliul.

Hifele se extind pe suprafața mediului, se diversifică și îndeplines anumite funcții specializate. Hifele de extindere se pot dezvolta și î profunzimea mediului realizând absorbția nutrienților și au rol de susținere hifele de răspândire se pot dezvolta de-a lungul mediului, sau aerian. La u anumit grad de dezvoltare a acestor hife vegetative se formează hifel reproducătoare, generatoare de spori, diferențiate în funcție de gen și specie Totalitea hifelor vegetative și reproducătoare alcătuiește miceliul.

Dezvoltarea mucegaiurilor are loc destul de rapid în condiții favorabile astfel în interval de 2-3 zile pe mediu nutritiv se formează colonii vizibile diferențiate. În cazul mucegaiurilor inferioare caracterizate prin miceliu coenocitic, aseptat, coloniile se dezvoltă rapid, sunt extinse, cu tendința de a ocupa tot spațiul disponibil, au aspect pâslos și culori alb, bej, cenușiu, brun.

Mucegaiurile superioare caracterizate prin miceliu septat formează colonii cu o creștere radială limitată și culori ce diferă de la alb la galben, brun, verde, portocaliu, albastru, cu diferite nuanțe specifice în funcție de gen și specie. Colonia matură de *Aspergillus, Penicillium*, poate fi divizată în zone de: extindere, productive, de fructificare și de învechire, zone cu activități metabolice diferențiate de la periferia coloniei spre centrul său. Când sporii de mucegai ajung la suprafața unui mediu nutritiv lichid, prin întrepătrunderea hifelor vegetative se formează o peliculă denumită *dermă*, la început netedă; în timp prin creșterea suprafeței, derma se cutează și la suprafață se dezvoltă hifele reproducătoare, se produce sporularea și colorarea specifică. Prin introducerea sporilor de mucegai în mediu lichid și cultivarea pe agitator rotativ, ca rezultat al agitării, mucegaiurile formează prin creștere vegetativă, sfere vizibile, întotdeauna de culoare albă.

Structură. Mucegaiurile au la bază celula de tip eucariot ce include, toate organitele descrise la celula de drojdie. Spre deosebire de drojdii, peretele celular este mai gros și în afară de α și β-glucani se găsește în cantitate mare celuloza. Între peretele celular și membrana citoplasmatică există un spațiu periplasmic. Celula poate conține 1-2 nuclei cu câte 2-4 cromozomi fiecare. În funcție de caracterele genetice mucegaiurile pot fi monocelulare când se dezvoltă sub forma unei celule uriașe cu ramificații, caz întâlnit la mucegaiurile inferioare ce au miceliu coenocitic. La mucegaiuri pluricelulare, peretele celular este comun pentru mai multe celule care sunt separate între ele printr-un perete despărțitor denumit *septum*, prevăzut cu un por central prin care se poate face transfer citoplasmatic. În condiții de stress există un mecanism de închidere rapidă a porului prin intermediul corpilor Woronin. Septumurile asigură rigiditatea hifei și permit localizarea unor efecte distructive (dereglări osmotice) la nivelul compartimentului, restul miceliului având o creștere normală.

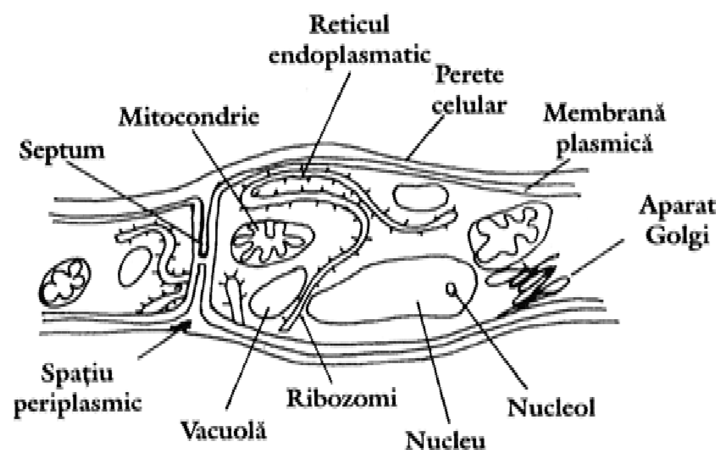


Fig. 10. Structura unui fragment hifal

Caractere fiziologice generale. Mucegaiurile sunt microorganisme ușor adaptabile deoarece au capacitatea de a forma enzime induse în funcție de natura substratului pe care se află, încât produc degradarea atât a produselor alimentare cât și a fibrelor textile, a cauciucului, betonului ș.a. În raport cu umiditatea, mucegaiurile sub formă de hife sau spori sunt foarte rezistente si se mențin în stare latentă de viață un timp îndelungat.

Mucegaiurile sunt puțin pretențioase la cantitatea de apă liberă prezentă în produs, de aceea ele pot produce mucegăirea produselor care se conservă prin uscare numai când acestea încep să absoarbă apă din mediul ambiant.

În raport cu oxigenul, mucegaiurile sunt microorganisme aerobe deci necesită pentru creștere prezența oxigenului din aer sau a oxigenului dizolvat în mediul lichid. Un număr limitat de specii sunt microaerofile și pot produce mucegăirea internă a untului și a ouălelor. Mucegaiurile se pot dezvolta în limite largi de pH (1,5-9), cu o valoare optimă in domeniu acid (pH 5,5-6).

Mucegaiurile sunt microorganisme mezofile cu temperaturi optime de creștere la 25°C, un număr restrâns sunt termofile-cele patogene au temperatura optimă la 37°C, iar altele sunt adaptate la temperaturi scăzute (0-3°C). Rezistența termică a mucegaiurilor sub formă de hife sau spori este mică, majoritatea sunt inactivate la temperaturi de 80°C; cei mai rezistenți spori sunt distruși la 88°C în 10 minute.

Reproducerea mucegaiurilor

Mucegaiurile se înmulțesc pe cale vegetativă și prin sporulare.

Reproducerea vegetativă se realizează prin intermediul fragmentelor de hife rupte sub acțiunea unor factori mecanici atunci când acestea conțin cel

puțin o celulă. Fragmentele hifale chiar când, de exemplu în cazul mucegaiurilor superioare, conțin mai multe celule, vor forma o singură colonie. Din acest motiv la determinarea numărului de mucegaiuri din diferite produse exprimarea se face în **unități formatoare de colonii (ufc)**.

Creșterea hifală este un mod de creștere înalt polarizată a celulei și este responsabilă pentru morfogeneza fungilor filamentoși. Creșterea are loc prin extensie la apexul celulei. În vârful hifei în creștere se acumulează niște vezicule în care sunt incluse enzime litice, enzime de sinteză și substanțe „precursori" ce intră în structura pereților celulari. În procesul de creștere veziculele sunt transportate prin citoplasmă până când ating apexul, apoi ele se unesc cu alte vezicule; venind în contact cu membrana plasmatică are loc o fuziune și veziculele depun conținutul lor în regiunea apicală. Enzimele litice acționează asupra miofibrilelor structurale care suferă o extindere, se formează noi miofibrile prin acțiunea enzimelor de sinteză și are loc creșterea.

Fungii filamentoși pot să crească în dimensiuni fără să modifice raportul între volumul de citoplasmă și suprafața hifelor, astfel încât schimbul de substanțe între miceliu și mediu implică transport numai pe distanțe scurte.

Se cunosc trei mecanisme prin care are loc reglarea creșterii miceliului și anume prin reglarea extinderii hifelor, prin inițierea de ramificații și prin distribuirea spațială a hifelor.

Rata medie a extensiei hifale în miceliu se poate calcula cu relația:

$$E = 2(H_t - H_0)/(B_0 + B_t)$$

unde: H_0 - μm lungime hifă la timp zero

H_t - lungime hitală după o oră;

B_0 - numărul de vârfuri hifale la t_0 și respectiv B_t după o oră.

Rata de extensie poate fi estimată cu relația:

$$E = G \cdot \mu$$

unde: G - lungimea medie a unitătii de creștere hifală

μ - rata specifică de creștere.

Astfel pentru *Geotrichum candidum* valoarea lui E, variază între 48-120μm/h iar pentru *Aspergillus niger* în mediu cu extract de malț, valoarea lui G, a fost de 33 μm iar rata medie de extensie hifală (E) egală cu 10,2 μm/h.

Particularități ale creșterii mucegaiurilor

Viteza de creștere. Multiplicarea unei singure celule poate fi descrisă prin următoarea ecuație:

$$\mu = \frac{1}{x} \cdot \frac{dx}{dt}$$

unde: x - masă celule, $g.dm^{-3}$

t - timpul derulat de la inoculare

μ - viteza specifică de creștere, h^{-1}

Prin integrare; $dx/x = \mu dt$ și $\ln x_{final}/x_{inițial} = \mu dt$

Dacă timpul de dublare este definit ca timp necesar pentru dublarea numărului de celule fungice, atunci $\mu t_d = \ln 2$ și $\mu = 0,693/t_d$

Numeroşi microbiologi au demonstrat că creşterea exponenţială are loc până la un anumit grad de extindere când difuzia nutrienţilor în miceliu devine limitată.

Solomons (1975) stabileşte că creşterea exponenţială reală poate conduce la o acumulare de biomasă celulară de 10-15 g (s.u.)/zi, m^3 mediu nutritiv, iar viteza maximă de creştere poate fi pentru *Aspergillus nidulans*, de exemplu, de $0,15h^{-1}$ la 25°C şi de $0,36h^{-1}$ la 37°C.

Creşterea exponenţială a mucegaiurilor este limitată în timp de scăderea progresivă a concentraţiei în substratul nutritiv.

Creşterea filamentelor fungice poate fi descrisă prin ecuaţia rădăcinii cubice:

$$x^{1/3} = x_0^{1/3} + Kt$$

Când hifa vegetativă depăşeşte o anumită mărime, nutrienţii nu mai pot difuza prin filamentul hifal suficient de rapid încât nu mai este menţinută creşterea nerestrictivă a miceliului. Acest proces are loc pentru că miceliul creşte ca o funcţie cubică în raport de raza hifei, în timp ce suprafaţa prin care componenţii substratului trebuie să difuzeze, creşte cu r^2. Astfel hifele vegetative după ce au ajuns la o anumită mărime vor mai prezenta creştere exponenţială numai prin capetele hifale. În timp ce creşterea mucegaiurilor pe un mediu nutritiv solid sub formă de colonie este de obicei lineară, cultivarea lor în mediu lichid, submers cu aerare, este de cele mai multe ori exponenţială.

Timpul de dublare a miceliului ca şi intervalul între cicluri succesive de formare a septumului depind de specie şi condiţii de cultură şi poate dura aproximativ 2 ore (*Aspergillus nidulans*). Se apreciază că pentru mitoza completă a nucleilor la mucegaiuri sunt suficiente 10 minute (*Alternaria, Aspergillus*) iar intervalul între mitoză şi apariţia septumurilor este de 20-40 minute. (Smith J.E; 1978).

Reproducerea prin sporulare

Este forma cea mai răspândită la mucegaiuri şi poate avea loc numai pe cale asexuată sau pe cale mixtă, respectiv asexuat când mucegaiul prezintă stare anamorfă şi sexuat când se află în starea teleomorfă.

1. Reproducerea pe cale asexuată; formarea sporilor imperfecţi.

Dintre tipurile de spori formaţi pe această cale prezintă interes: sporangiosporii şi conidiosporii.

Sporangiosporii sunt spori endogeni, haploizi (monocelulari) caracteristici mucegaiurilor inferioare. La maturitate pe thalul coenocitic se formează hifa reproducătoare denumită şi sporangiofor care se continuă cu o formaţiune cu diametrul mai mare decât al hifei purtătoare, denumită columelă. Prin acumularea de nuclei şi în urma procesului de mitoză, sporii rezultaţi se acumulează în exteriorul columelei şi se maturizează în spaţiul dintre columelă şi membrana sporangelui. În urma presiunii exercitate prin creşterea în

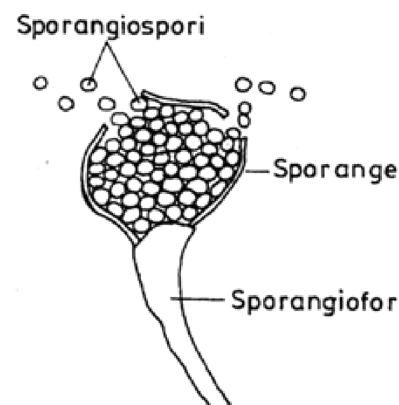


Fig. 11. Formarea de sporangiospori

dimensiuni a sporilor, sau sub acţiunea unor factori mecanici, membrana sporangelui se rupe şi sporangiosporii se răspândesc în mediul ambiant. Sporangele cu columelă mai poartă denumirea de **stilosporange** iar sporangele lipsit de columelă, cea de **sporangiol**. Se înmulţesc prin sporangiospori mucegaiuri din genurile *Mucor, Rhizopus, Absidia, Thammidium* ş.a.

Conidiosporii sunt spori exogeni sau endogeni, mono sau pluricelulari, caracteristici mucegaiurilor superioare cu miceliu septat. Se pot forma pe cale thalică, în urma transformărilor ce au loc în thal, sau pe cale blastică, când sporii rezultă printr-un proces de înmugurire a celulelor conidiogene.

a) Dintre conidiosporii formaţi pe **cale thalică** fac parte:

Arthrosporii se formează prin fragmentarea thalului în dreptul septumului; după separare au tendinţa de a se aranja în zig-zag. Se reproduc prin arthrospori, mucegaiurile din genul *Geotrichum*.

Chlamidosporii (Chlamys-manta) se formează în culturi mai vechi de-a lungul thalului vegetativ, în cazul mucegaiurilor inferioare din genul *Mucor*, sau în interiorul conidiosporilor pluricelulari, în cazul mucegaiurilor din genul *Fusarium*.

b) Dintre conidiosporii formaţi pe **cale blastică** fac parte;

Aleuriosporii - se formează la capătul conidioforului sau pe partea laterală a acestuia, izolat sau în lanţ, din celule conidiogene nediferenţiate care se deformează la capătul apical din care se separă sporii. Aleuriosporii se întâlnesc la mucegaiuri din genul *Sporotrichum*, genul *Trichothecium* ş.a.

Annelosporii- se formează în interiorul unor celule cilindrice sau în formă de sticlă din care se eliberează prin ruperea peretelui celular care înconjoară cu un collar fiecare spor. Produc annelospori mucegaiuri din genul *Scopulariopsis*.

Blastosporii - se formează prin înmugurire la apexul conidioforului sau din celule conodiogene preformate, izolat sau în lanţuri lungi. Înmulţirea prin blastospori este întâlnită la mucegaiuri aparţinând genurilor: *Cladosporium, Aureobasidium, Monillia* ş.a.

Botrioblastosporii - se formează simultan, apical, din celule mărite ale conidioforului sau din scurte protuberanţe ale acestora, prin înmugurire, izolat sau în lanţuri. Se întâlnesc la genul *Botrytis*.

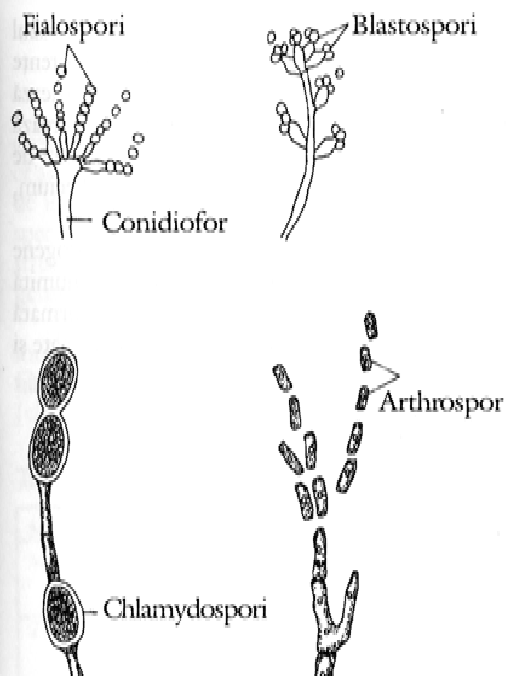


Fig. 12. Tipuri de conidiospori

Fialosporii - sunt spori exogeni eliberaţi printr-un orificiu central, din celule specializate denumite fialide (phialidae). Fialosporii se formează pe cale bazipetală, izolat sau în lanţuri şi sunt întâlniţi la genurile: *Aspergillus, Penicillium, Trichoderma, Stachybotris, Fusarium*

Porosporii - sunt spori pluricelulari formaţi prin înmugurire în interiorul celulei conidiogene din care se eliberează prin canale fine, apical sau lateral, pe care acropetală, astfel încât la capătul superior al lanţului se află cel mai tânăr dintre sporii rezultaţi. Se reproduc prin porospori specii ale genurilor: *Alternaria, Helminthosporium*.

2. Reproducerea pe cale sexuată: formarea sporilor perfecţi

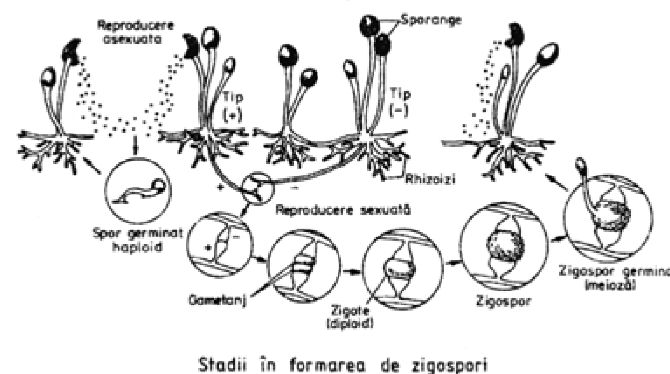
Calea sexuată de sporulare este întâlnită la fungii filamentoşi şi reprezintă un criteriu important în clasificarea acestora. Sporii perfecţi rezultaţi în urma unor procese de conjugare ce au loc mai ales în condiţii naturale, pot fi de mai multe tipuri:

Oosporii - întâlniţi la mucegaiuri inferioare, iau naştere într-o formaţiune denumită oogon sub forma de oosfere cu potenţă pozitivă. Pe hifa vegetativă se formează lateral un antheridium care în zona de contact cu oogonul favorizează migrarea nucleilor cu potenţă negativă; în urma procesului de copulare şi diviziune, oosferele se transformă în oospori care prin ruperea oogonului asigură reproducerea speciei.

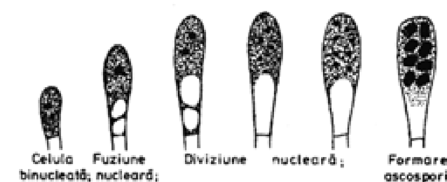
Zigosporii - sunt spori cu dimensiuni mari (100-200 μm) şi suprafaţa rugoasă foarte rezistenţi la condiţiile mediului ambiant. Când zigosporul ajunge în condiţii favorabile de viaţă, germinează, iar din hife, pe cale asexuată se formează sporangiospori haploizi cu potenţe diferite (+/-). Prin copularea acestora la zona de contact se formează un progametanj apoi prin liza peretelui celular şi copulare rezultă zigosporul diploid. Zigosporii pot fi întâlnii la mucegaiuri inferioare din genul *Rhizopus* ş.a. (Fig. 13).

Ascosporii sunt caracteristici mucegaiurilor superioare. Ca şi în cazul drojdiilor ascogene, ascosporii se formează într-o ască unde nuclei cu potenţe diferite copulează, se formează zigoţii diploizi care prin meioză formează ascospori haploizi ce includ informaţia genetică a speciei şi care se eliberează în mediu. În funcţie de gen şi specie, la mucegaiuri, celulele formatoare de ascospori pot fi grupate în formaţiuni specifice, macroscopice: pherithecium, cleistothecium ş.a.

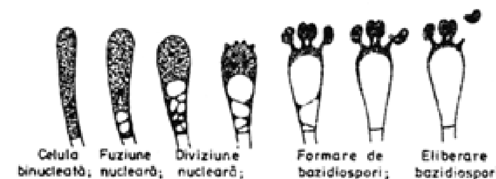
Bazidiosporii - sunt spori perfecţi întâlniţi la micromicete fitopatogene cu un ciclu evoluat de dezvoltare. Sporii iau naştere într-o formaţiune denumită basidium în care are loc acumularea de nuclei, copularea şi diviziunea, urmată de migrarea bazidiosporilor haploizi în protuberanţe terminale - sterigmate şi eliberarea lor din formaţiunea bazidiogenă.



Stadii în formarea de zigospori



Stadii în formarea de ascospori.



Stadii în formarea de bazidiospori.

Fig. 13. Formarea de spori perfecţi

Clasificarea generală a mucegaiurilor

Mucegaiurile reprezintă un grup taxonomic complex, motiv pentru care clasificarea acestora este în continuă transformare. Numărul posibil de specii ce ar putea exista în natură este apreciat la aproximativ 250.000. Mucegaiurile de interes alimentar sunt grupate în 20 de genuri și aproximativ 1000 de specii (Spicher, 1990). Clasificarea are la bază anumite criterii morfologice structură, caractere coloniale, pigmentogeneză, integrate cu date fiziologice și genetice.

Mucegaiurile fac parte din diviziunea EUMYCOTA, care cuprinde și micromicete cu plasmodium absent, frecvent și tipic filamentoase (fungi filamentoși) și sunt clasificate în următoarele subdiviziuni, clase, ordine și genuri (clasificare selectivă după Hawksworth ș.a. 1986).

Tabel 4. Clasificarea generală a mucegaiurilor

Subdiviziuni	Clase	Ordine	Genuri
Mastigomycotina	Oomycetes		Achlya, Phytophtora, Phytium, Saprolegnia
	Zygomycetes	Mucorales	Absidia, Blakesica,
Zygomycotina			Mucor, Phycomyces, Rhizomucor, Rhizopus, Thamnidium
		Entomophthorales	Entomophthora
	Plectomycetes (Plectascales)	Eurotiales	Byssochlamys, Emericella,
Ascomycotina (Ascomycetes)			Eupenicilium, Eurotium, Monascus, Neosartorya, Petromyces, Talaromyces
	Pyrenomycetes	Sphaeriales	Neurospora
		Clavicipitales	Claviceps
		Hypocreales	Gibberella
	Hemiascomycetes	Endomycetales	Eremothecium, Ashbya
		Taphrinales	
	Discomycetes	Pezizales	Morchella, Tuber, Sclerotinia
Basidiomycotina (Basidiomycetes)	Hemibasidiomycetes (Teliomycetes)	Uredinales	Puccinia
		Ustilaginales	Ustilago
Deuteromycotina (Deuteromycetes-fungi imperfecți)	Coelomycetes		Colletotrichum
	Hyphomycetes-forme levuriene forme filamentoase)	Moniliales	Alternaria, Aspergillus, Aureobasidium, Botrytis, Cladosporium, Curvularia, Fusarium Geotrichum, Gliocladium, Monillia, Paecilomyces, Penicillium, Stachybotris, Trichoderma, Trichothecium, Verticilium

Descrierea mucegaiurilor cu importanță în industria alimentară

Din microbiota produselor alimentare, se vor descrie principalele caracter de gen și specie ale mucegaiurilor care să permită recunoașterea celor ma importante genuri descrise în clasificare.

1. MASTIGOMYCOTINA - cuprinde mucegaiuri inferioare cu miceli aseptat care se reproduc prin oospori, pe cale sexuată.

G. Peronospora - cu specii fitopatogene, produc mana viței de vie.

G. Plasmopara - cu specia *P. helianthi*, produce mana la floarea soarelui.

G. Phytium - include agenți ce produc putrezirea plăntuțelor de grâu ș frângerea tulpinelor tinere.

G. Phytophtora - cu specia *P. infestans*, agentul producător al manei la cartofi.

G. Achlya și g. Saprolegnia - produc boli la pești.

2. ZYGOMYCOTINA - cuprinde mucegaiuri inferioare cu miceliu aseptat care se reproduc prin zigospori pe cale sexuată și prin sporangiospori și chlamidospori pe cale asexuată. Din ordinul Mucorales, fam. Mucoraceae, frecvent pe produse alimentare se întâlnesc următoarele genuri:

Mucor (88 specii) - se caracterizează prin formarea de sporangiospori în stilosporange, la maturitate prin ruperea membranei și eliberarea sporilor rămâne la baza columelei, un collar. Sporangioforii pot fi repartizați de-a lungul hifelor vegetative, monopodial, simpodial sau dichotomic. În funcție de specie, columela poate avea dimensiuni și forme diferite. Dintre speciile mai importante ale genului: *M. mucedo* - denumit și mucegaiul alb al pâinii, *M. racemosus* - agent de putrezire a fructelor și legumelor, *M. pussillus și M. miehei* - specii selecționate pentru obținerea de proteaze cu acțiune similară cu cea a cheagului animal.

Rhizopus - (11 specii) se caracterizează prin stilosporange de dimensiuni mari, cu columelă semisferică, fără collar după ruperea membranei sporangelui. Sporangioforii se dezvoltă în mănunchi dintr-un punct în care se dezvoltă rhizoizi-hife de susținere cu rol absorbant. Extinderea coloniei are loc rapid ca urmare a formării unor lăstari micelieni denumiți stoloni. Specia cea mai răspândită pe toate produsele alimentare este *Rh. stolonifer* (sin. Rh. nigrificans) - agent de mucegăire a fructelor și legumelor. Tulpini selecționate pot fi folosite pentru obținerea pe cale fermentativă a acidului fumaric. Împreună cu *Rh. oryzae și Rh. delemar*, producătoare de amilaze, se pot folosi la obținerea unor produse fermentate pe bază de cereale, de tip tempeh și arrak (J. Baumgart, 199).

Thamnidium - se caracterizează prin formarea de sporangiofori terminați cu un stilosporange mare sub care se dezvoltă sporangiofori scurți

purtători de sporangioli cu un număr mic de sporangiospori. *Th. elegans* produce mucegăirea produselor conservate prin refrigerare.

Absidia - prezintă sporangi mici cu columelă de formă conică. Sporangioforul are la capăt o apofiză largă sub care se observă un sept. Unele specii sunt termofile și produc îmbolnăviri la aminale și om. Poate produce mucegăirea porumbului și elaborează toxine.

3. ASCOMYCOTINA - cuprinde mucegaiuri superioare cu miceliu septat care se reproduc pe cale asexuată și sexuat prin ascospori.

Byssochlamys - produce asci cu 8 ascospori termorezistenti și produce alterarea alimentelor conservate cu acizi. *B. fulva și B. nivea* produc alterarea conservelor de fructe. Este teleomorf al uno specii de mucegaiuri incluse în g. Paecilomyces, întâlnite rar pe alimente.

Emericella - include starea perfectă a speciei *Aspergillus nidulans*, produce cleistoteciu cu ascospori.

Eurotium - include starea perfectă-teleomorfă a mucegaiurilor din grupul *Aspergillus glaucus*. Produc cleistotecii galbene cu ascospori. *E. herbariorum* este xerofil și poate produce alterarea gemurilor și a jeleurilor.

Monascus - cu specia *M. ruber* este folosit pentru obținerea de coloranți roșii de uz alimentar.

4. BASIDIOMYCOTINA - cuprinde mucegaiuri superioare cu ciclu de viață mai evoluat și care se reproduc pe cale sexuată prin bazidiospori.

Puccinia - cuprinde specii fitopatogene agenți ai ruginii cerealelor.

Ustilago - produc la grâu și porumb, boala denumită popular - tăciune.

5. DEUTEROMYCOTINA (Fungi imperfecți) - cuprinde numeroase genuri și specii de mucegaiuri superioare care se reproduc prin conidiospori și la care nu există calea sexuată de sporulare sau aceasta nu a fost încă evidențiată.

Aspergillus (132 specii) cuprinde numeroase specii cu importanță biotehnologică. Se caracterizează prin formarea de condiofori drepți, neramificați care poartă capul conidial alcătuit dintr-un suport anatomic denumit veziculă pe care se dezvoltă celulele conidiogene - respectiv fialide, generatoare de lanțuri lungi de fialospori. Fialidele primare se pot dezvolta pe veziculă într-un singur strat-fialide primare, sau în două straturi suprapuse. Fialidele primare, au forma unor celule mai groase, lungi, iar fialidele secundare sunt mai scurte și subțiri. Conidiosporii au forma globoasă, elipsoidală sau ovală și formează lanțuri lungi care se pot interconecta prin intermediul unor punți plasmatice. Capul conidial are forma sferică atunci când fialidele cresc pe toată suprafața fertilă a veziculei sau forma columnară, atunci când vezicula este fertilă numai în partea sa superioară și poate fi vizibil la unele specii. Din punct de vedere taxonomic speciile genului Aspergillus sunt divizate în 18 grupe ce includ specii cu caractere înrudite și care poartă denumirea speciei tip. Grupele mari pot fi divizate în serii (Fassatiova, 1983).

A. niger - formează colonii radiale de culoare brun-negru, prezintă dou rânduri de fialide pe toată suprafața veziculei, capul conidial este sferic. Numeroase tulpini selecționate sunt folosite pentru obținerea de enzime amilaze, proteaze, glucozoxidaze, invertaze, enzime pectolitice sau pentru obținerea acizilor organici: acid citric, acid lactic, gluconic.

A. oryzae - formează colonii de culoare bej-oranj cu conidiofori drepți și cap conidial sferic cu un singur rând de fialide. Este numit pe drept cuvânt "arsenalul enzimelor" deoarece se cunosc peste 200 de enzime elaborate de mucegai și obținute în stare purificată. Este folosit pentru obținerea de enzime amilolitice - tip koji, pentru zaharificarea plămezilor amidonoase din orez și obținerea unor băuturi fermentate - sake.

Pentru obținerea de amilaze: alpha-amilaze și glucoamilaze mai pot fi folosite speciile: *A. awamori, A. phoenicis, A. usamii, A. cinnamommeus.*

A. flavus - formează colonii de culoare alb-gălbui la maturitate galben-verzui spre brun cu revers colorat în galben-brun. Capul conidial este tipic radial, uneori columnar. Fialidele sunt uniseriate sau biseriate, cu diferențe mari în formă și dimensiuni. Fiolosporii sunt piriformi sau globoși, galben-verzui, rugoși. Este răspândit în sol, pe produse vegetale și are capacitatea de a produce **aflatoxine** - micotoxine cu efect cancerigen.

Penicillium - (453 specii) se caracterizează prin formarea unui aparat reproducător ramificat alcătuit din ram, metule, fialide și fialospori cu diferențieri morfologice în funcție de specie. În cadrul genului, specii selecționate sunt folosite la obținerea brânzeturilor cu pastă albastră - *P. roqueforti*, a brânzeturilor cu pastă moale - *P. camemberti*, la maturarea salamurilor crude uscate - *P. nalgiovense*. Pentru obținerea de antibiotice din grupa penicilinelor se folosesc tulpini de *P. notatum* și *P. chrysogenum*. Numeroase specii sunt agenți de putrezire și pot produce micotoxine: *P. expansum, P. islandicum, P. citrinum* ș.a.

Botrytis - formează colonii extinse, pâsloase, de culoare cenușie. Conidioforii poartă terminal un mănunchi de ramuri scurte purtătoare de botrioblastospori de formă elipsoidală.

B. cinerea (Botryotinia fuckeliana) - este denumit mucegaiul cenușiu și poate produce putrezirea vulgară sau nobilă a strugurilor. Specii fitopatogene dau boli la floarea soarelui și alterări în depozit ale fructelor și legumelor.

Fusarium - include specii saprofite răspândite în sol și specii patogene parazite ale plantelor superioare. Se reproduc prin conidiospori monocelulari - microconidii și pluricelulari - macroconidii cu caractere distinctive în funcție de specie. Dau putrezirea brună a fructelor citrice, putrezirea umedă a smochinelor, mucegăirea cerealelor (orz, grâu) cu producerea de micotoxine - trichothecene: *F. graminearum, F. moniliforme, F. tricinctum, F. nivali* ș.a.

Cladosporium - formează colonii cu aspect catifelat de culoare brun-oliv cu revers colorat în bleumarin-negru. Se reproduc prin blastospori în formă de lămâie.

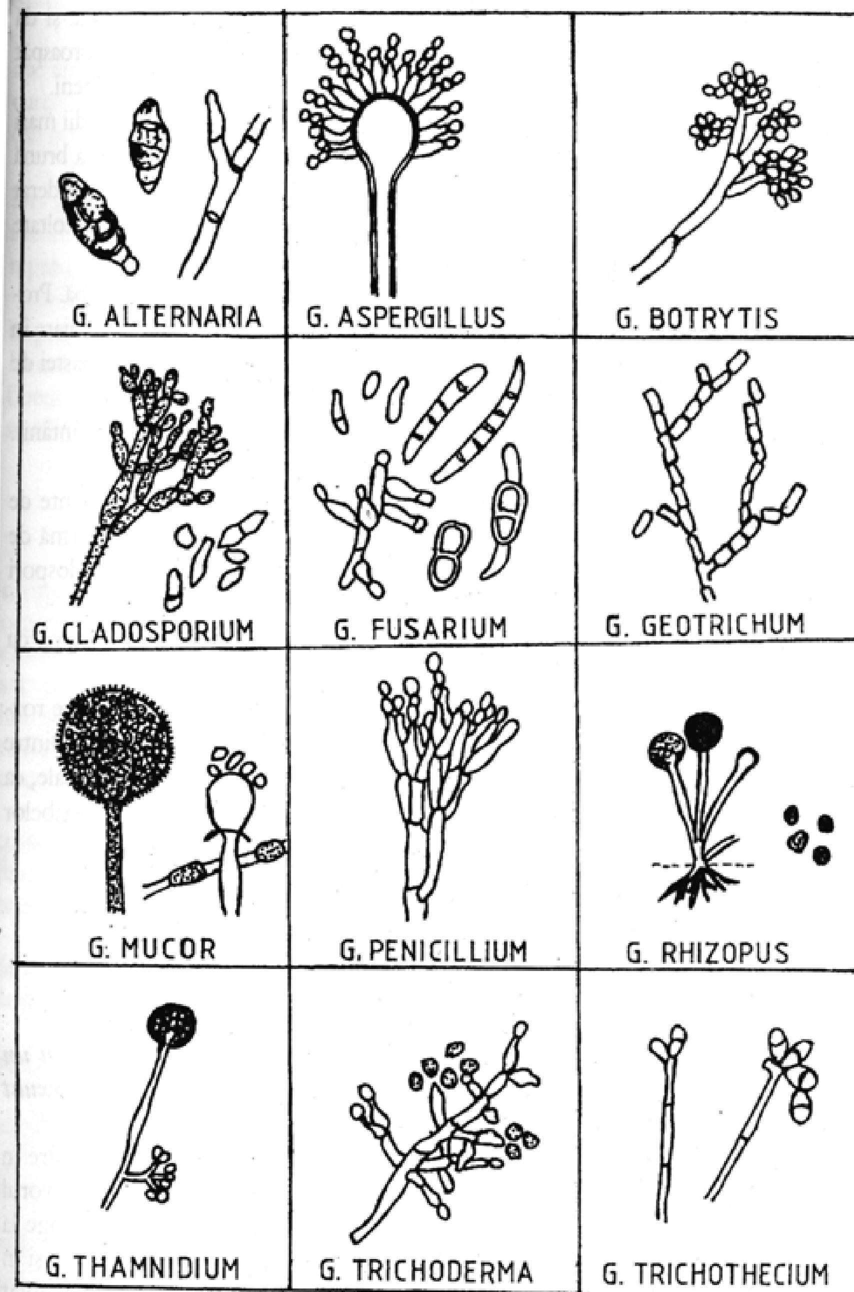


Fig.14. Genuri reprezentative de mucegaiuri

Cl. herbarum poate forma pete inestetice pe carcase de carne şi d mucegăirea untului şi margarinei. Este prezent în microbiota cerealelor proaspă recoltate. Este agent al putrezirii negre a strugurilor şi pepenilor galbeni.

Alternaria - formează colonii pufoase cu miceliu septat şi conidii ma cu septumuri longitudinale şi transversale(porospori). Dau putrezirea brun a fructelor: mere, smochine, putrezirea neagră a fructelor citrice. Este considera mucegai de câmp şi este prezent pe suprafaţa seminţelor proaspăt recoltat fiind folosit ca indice de prospeţime a cerealelor.

Geotrichum - formează colonii extinse, catifelate de culoare albă. Pro duce miceliu septat din care se separă arthrospori ce au tendinţa de aranjare î zig-zag. *G.candidum* este întâlnit în industria laptelui şi la fabricarea pastei de tomate, drept contaminant al utilajelor (mold-machine).

G.albidum dă putrezirea fructelor citrice, a caiselor, alterarea smântânii (Jay 1992)

Trichoderma - formează colonii extinse pufoase sau pulverulente de culoare gălbui spre verde. Conidiosporii se formează pe fialide în formă de sticlă şi cresc pe ramuri laterale, în mănunchi. Formeaza frecvent chlamidospor elipsoidali, hialini.

T. reesei (viridae) produce activ celulaze şi un antibiotic-gliotoxina cu efect fungistatic faţă de mucegaiuri care produc putrezirea lemnului.

G. Trichothecium - formează colonii cu aspect pufos de culoare roz portocaliu. Se reproduce prin conidiospori bicelulari (aleuriospori). Dintre cele 4 specii ale genului *Tr. roseum* este cel mai întâlnit pe reziduri vegetale, ca agent al putrezirii fructelor (pepene galben). Este întâlnit pe suprafaţa boabelor de cereale: grâu, orz, porumb şi poate produce mucegăirea pâinii.

(Fassatiova O, 1986) (Dan V. ş.a., 1999)

3.3. BACTERII

Bacteriile sunt microorganisme monocelulare de tip procariot cu un cromozom unic, cu dimensiuni medii între 0,5-8μm, care se înmulţesc asexuat prin sciziune binară, izomorfă.

Răspândire. Bacteriile sunt microorganisme cu o largă răspândire în natură, ca rezultat al adaptării lor în cursul procesului de evoluţie. Rezervorul natural al bacteriilor este solul unde concentraţia de celule poate ajunge la valori de 10^7-10^9 g^{-1} atât în straturile superficiale (bacterii aerobe), cât şi în straturile de profunzime (bacterii anaerobe). Din sol, bacteriile s-au adaptat să trăiască în ape, unde concentraţia de celule poate fi între $10.cm^{-3}$ în apa de izvor, până la valori de 10^{12} $.cm^{-3}$, de exemplu, în ape fecalo-menajere.

Bacteriile se pot întâlni la adâncimi mari în apa mărilor și oceanelor, în ape termale. Existența în aer a bacteriilor este temporară și prin intermediul curenților de aer sunt răspândite la distanțe foarte mari. Din aer, sunt antrenate din nou în sol prin intermediul precipitațiilor atmosferice.

Bacteriile fac parte din microbiota naturală a plantelor și animalelor. Din sol, prin creșterea plantelor, bacteriile ajung la suprafața acestora și se mențin în stare activă până când condiții favorabile le permit creșterea și reproducerea.

În organismul animal există o microbiotă bacteriană intestinală cu rol important în transformarea bolului alimentar și în imunitatea organismului. La animalele ierbivore, bacteriile anaerobe din rumen contribuie la degradarea fibrelor celulozice, în procesul de nutriție. Din organismul animal, bacteriile se elimină în mediul ambiant prin intermediul materiilor de dejecție.

Rolul bacteriilor în natură și în industrie

În condiții naturale bacteriile au un rol imens în transformarea compușilor macromoleculari în compuși simpli, prin mineralizarea materiei organice nevii, contribuind astfel la realizarea naturală a circuitului unor elemente de importanță vitală: carbon, azot, sulf, fosfor, fier ș.a. Datorită activității microorganismelor din sol se formează rezerva de substanțe nutrive-humusul, necesar pentru dezvoltarea plantelor. Pe drept cuvânt se consideră că fără activitatea bacteriilor agenți ai putrefacției, "pământul s-ar transforma treptat într-un uriaș cimitir".

În industria alimentară bacterii selecționate sunt folosite în calitate de culturi starter al unor procese fermentative, și anume: bacterii lactice la fabricarea produselor lactate, a brânzeturilor, în industria panificației, la conservarea legumelor, măslinelor, furajelor verzi ș.a.

Bacteriile propionice se folosesc la fabricarea brânzeturilor tip schwaitzer deoarece prin fermentare produc acid propionic și CO_2, responsabil pentru desenul caracteristic al acestor produse.

Bacteriile acetice produc fermentația alcoolului etilic și sunt folosite pentru obținerea industrială a oțetului.

Pe căi biotehnologice, cu culturi bacteriene selecționate sau mutanți ai acestora, se obțin produse cu o mare valoare economică, de exemplu: enzime, proteine, aminoacizi, acid lactic, acid acetic, solvenți (acetonă, alcool izopropilic, alcool butilic), hormoni (insulina produsă de un mutant de *Escherichia coli*), îngrășăminte biologice (*Azotobacter*), insecticide biologice (*Bacillus thuringiensis*), antibiotice (*Streptomyces sp.*), vitamine (*Propionibacterium shermani*-vitamina B_{12}) ș.a.

În același timp trebuie subliniate și unele aspecte negative ale activității bacteriilor. Astfel în industria alimentară bacteriile pot acționa ca agenți de alterare ai produselor alimentare (acrirea berii, vinului, putrefacția cărnii ș.a.).

Un grup de bacterii care cresc pe alimente pot produce toxine încât prin ingerarea alimentelor contaminate se produc stări de toxiinfecții alimentare. Alte bacterii patogene, sunt adaptate să paraziteze organele vii și dau îmbolnăviri grave (tuberculoza, febra tifoidă, dizenteria, sifilis, bruceloza, antrax, ș.a., bacterioze la plante).

Caractere morfologice ale bacteriilor

Bacteriile prezintă forme celulare foarte diversificate, dintre care, forme de bază, monocelulare precum și forme derivate ale acestora ce rezultă în urma asocierii celulelor rezultate prin reproducere.

Dintre formele de bază fac parte următoarele:

- Forma sferică - denumită *coccus*, în care sfera este perfectă, de exemplu la micrococi sau ovalară, de exemplu la enterococi, lanceolată la pneumococi și reniformă la gonoci.
- Forma bacilară - cilindrică, este cel mai frecvent întâlnită, este denumită și *bacterium*. Formele pot fi drepte cu capete rotunjite -*g.Enterobacter*, cu capete retezate -*g.Bacillus*, fusiforme, măciucate (*g.Corynebaterium*), cu diametru variabil - *g.Mycobacterium* .
- Dintre formele spiralate-elicoidale, specifice bacteriilor patogene, fac parte: forma *vibrio* (g.*Vibrio comma*-agentul holerei), forma *spirillum* sub forma unor filamente rigide cu spire largi, forma *spirocheta* sub forma unor filamente flexibile cu mai multe spire-(agentul sifilisului).
- Formele filamentoase sunt caracteristice bacteriilor miceliene cu habitatul în sol și ape (actinomicete; chlamydobacterii ș.a.)

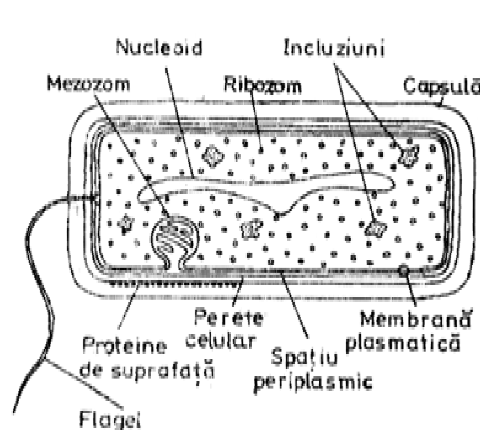


Fig. 15. Structura celulei bacteriene.

Structura celulei bacteriene. Bacteriile au celule de tip procariot, mai simplificată decât celula eucariotă; principalele diferențe constă în faptul că are un singur cromozom amplasat într-un nucleoid lipsit de membrană nucleară, iar celula nu conține organite prevăzute cu membrană. Părțile componente ale celulei bacteriene sunt: peretele celular și structuri extraparietale, membrana plasmatică și structuri interne ale acesteia în citosol (Prescott, 1987).

Membrana plasmatica (plasmică) - are o structură lipoproteică, o grosime de 5-10 nm și este alcătuită din fosfolipide la care grupările hidrofile (polare) sunt în exterior iar cele hidrofobe reprezentate de acizii grași se orientează spre interior, obținându-se astfel straturi de molecule amplasate cap la cap. Între cele două straturi lipidice se întâlnesc molecule de proteine ce pot fi extrinseci sau periferice cât și proteine intrinseci sau integrate, amplasate cu partea hidrofobă în stratul lipidic. Aceste proteine globulare pot să difuze deplasându-se de-a lungul mozaicului fluid, imprimând membranei o structură dinamică.

Membrana plasmatică are un rol vital pentru bacterii deoarece reține citosolul și organitele asociate cu membrana. Are rol de barieră osmotică cu o permeabilitate selectivă reținând componentele utile celulei. La nivelul membranei sunt localizate enzime și alte proteine specifice, care asigură transportul activ al nutrienților în celulă. Membrana plamică este locul de desfășurare al unor procese metabolice (respirație, fotosinteză) la unele bacterii lipsite de perete celular.

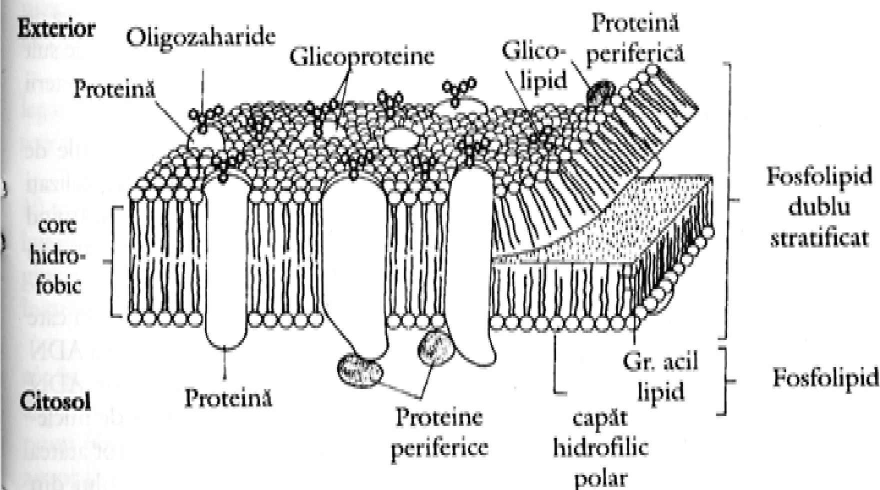


Fig. 16. Structura membranei plasmatice

Structuri interne ale membranei plasmatice

- **Mezozomi** (corpi membranoși) -rezultă prin invaginări ale membranei, se află în număr redus (1-2/celulă) și au un rol important în activitatea fiziologică celulară. Mezozomii asigură o creștere a suprafeței active a membranei și sunt implicați în procesul de reproducere deoarece pot lega

moleculele de ADN rezultate prin diviziune și să le deplaseze în celulele n formate. Au rol în sinteza peretelui celular și intervin în procese secretorii metaboliților.

- **Vacuole de gaz** - au fost puse în evidență cu ajutorul microscopul electronic; se prezintă sub formă cilindrică cu pereți rigizi alcătuiți din mo ecule de proteine, impermebili la apa și permebili pentru gaz. Au rol în flota bacteriilor și în funcție de presiunea de gaz din vacuole bacteriile pot să amplaseze în mediu lichid la adâncimea care le oferă condiții optime pent viață.

- **Matrixul citoplasmatic** reprezintă substanța cuprinsă între membra plasmică și nucleoid; conține în stare solubilă sau de gel, compuși de natu organică sau anorganică.

Incluziunile organice pot fi formate din glicogen (poliglucid cu mo ecule de glucoză legate α 1-4 și α 1-6), poly-β-hidroxibutirat (PHB) și une lipide ce pot fi puse în evidență prin metode de colorare.

Incluziile anorganice pot fi incluzii metacromatice de *volutină* - polim linear alcătuit din ortofosfați legați prin legături esterice, reprezintă rezerva d grupări fosfat pentru celulă. La unele bacterii sunt prezente incluziuni de su sau incluziuni de oxid feric (magnetit) care va permite orientarea acestor bacte în câmp magnetic.

- **Ribozomii** - sunt alcătuiți din molecule de ARN și molecule d proteine, au dimensiuni (14-20nm) mai mici decât la eucariote și pot fi localiza în zona membranară, cu rol în biosinteza de enzime sau în citosol alcătuin așa numitul reticul ribozomal cu rol în biosinteza de proteine ce intră î structura celulei.

- **Nucleoidul** (material nuclear) - reprezintă o zonă din matrix în ca este localizat cromozomul bacterian. Acesta este format dintr-o molecula AD dublu spiralat -60%, cantități mici de ARN și proteine. Molecula de AD poate avea o lungime de aproximativ 2μm cu un număr de perechi de nucl otide de 5,10^6 ce pot alcătui până la 1000 de gene ce pot transmite tot atât caractere. La bacteriile de dimensiuni mai mari, în afara ADN-ului di cromozom se găsește și ADN extracromozomial în plasmide circulare, care s pot replica independent; nu sunt necesare pentru creștere dar prezintă inter în ingineria genetică.

Peretele celular și structuri extraparietale

Peretele celular are o mare diversitate structurală ce influențeaz comportarea celulelor la diferite condiții de mediu și condiționează afinitate tinctorială a bacteriilor. În 1884 Christian Gram a constatat că bacterii reacționează diferit atunci când se aplică aceeași tehnică de colorare și pun

baza metodei diferențiale de colorare ce îi poartă numele, prin care bacteriile sunt împărțite în două mari grupe bacterii: Gram-pozitive și bacterii Gram-negative. Peretele celular este alcătuit dintr-un strat bazal și din stratul structurilor specifice, situat în exteriorul celulei, diferențiat la cele două grupe de bacterii.

Stratul structurilor specifice. Bacteriile Gram pozitive au stratul structurilor specifice alcătuit dintr-un strat omogen cu grosimea de 20-80 nm alcătuit din molecule de peptido-glucan (mureină) și acid teichoic (polimer alcătuit din molecule de glicerol/ribitol legate prin legături fosfat). Peptidoglucanii sunt întâlniți numai la bacterii, repartizați în unul sau mai multe straturi pe suprafața celulei. În structura sa se întâlnesc unități repetate de N-glucozamină (NAG) și acidul N-acetylmuramic (NAM) legate prin legături β1-4; la NAM se atașează un petrapeptid în compoziția căruia intră aminoacizi în următoarea succesiune; L-alanina, acid D-glutamic, acid mezodiaminopimelic, D-alanina. La bacteriile Gram pozitive în loc de acid diaminopimelic în tetrapeptid se găsește L-lizina. Tetrapeptidele sunt implicate în formarea de punți care permit legarea de lanțuri poliglucidice lineare pentru a forma straturi de peptidoglucani dând structuri similare unui sac ce înconjoară celula.

Acidul teichoic are o funcție importantă în celulă și anume aceea de legare a cationilor cu rol în asigurarea funcționalității membranei și cea de receptor pentru bacteriofagi.

Bacteriile Gram negative au stratul de peptido-glucan mai subțire (2-10 nm) și acesta este protejat spre exterior de o membrană cu o structură complexă în care se află molecule de lipoproteine legate prin legături covalente de peptido-glucan, lipopoliglucide și proteine denumite *porine* deoarece creează canale înguste în membrană. La bacteriile Gram negative sunt absenți acizii teichoici.

Stratul bazal adiacent plasmalemei este comun pentru toate bacteriile are în componență peptido-glucanul, un polimer ce conține o rețea formată din filete poliglucidice (N-acetil muramic +N acetilglucozamina) legate prin punți peptidice. În timp ce la bacteriile Gram + stratul peptido-glucanic este apropiat de membrana plasmică, la bacteriile Gram - se află un spațiu periplasmic, în care s-au pus în evidență enzime, proteine, ș.a.

Un grup de bacterii patogene din care face parte și agentul tuberculozei - *Mycobacterium tuberculosis* au în componența peretelui celular: peptido glucan, lipoproteine, acid micolic, ceruri, sulfolipide, micozide și acestea nu se colorează prin metoda Gram. Pentru studiul acestor bacterii de tip AAR (acido-alcoolo-rezistente) se folosește metoda Ziehl-Nelsen. (Zarnea,1992).

Peretele celular asigură forma (rigiditatea) celulei și protecția față de liza osmotică; (se consideră că presiunea internă este de aprox. 20 atm.), protejează celula de substanțe toxice, antibiotice ș.a. iar în cazul unor bacterii contribuie la patogenitate.

Comportarea bacteriilor în funcție de structura peretelui celular, în timpul colorării după metoda Gram.

Pentru studiul microscopic al bacteriilor se execută un frotiu uscat și fixat și se parcurg următoarele etape de colorare:

Colorarea cu cristal violet sau violet de gențiană și *mordansarea* cu soluție Lugol. În această fază indiferent de afinitatea tinctorială toate bacteriile vor apare de culoare violet în câmpul microscopic.

- *Spălarea frotiului colorat cu un amestec de alcool-acetonă.* După această fază de diferențiere, la microscop bacteriile Gram-pozitive își mențin culoarea violetă (colorantul primar), deoarece în prezență de solvenți se produce o micșorare a ochiurilor din rețeaua peptido-glucanică a peretelui lor celular, încât complexul colorat format intracelular nu poate difuza în exteriorul celulei. În cazul bacteriilor Gram-negative după spălare cu alcool-acetonă acestea pierd colorantul primar deoarece stratul glucanic subțire nu poate reține complexul de culoare, iar lipidele din membrana externă, solubile în solvenți crează zone prin care are loc difuzia spre exterior a colorantului.

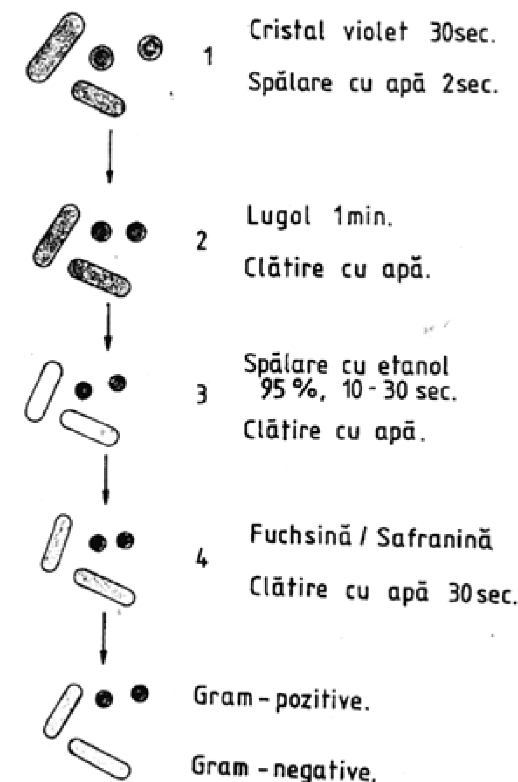


Fig. 17. Etapele colorării Gram

- *Colorarea complementară cu fuchsină sau sufranina*, este necesară pentru evidențierea bacteriilor Gram negative. Acestea fiind libere de colorant vor absorbi colorantul secundar încât dacă pe același frotiu se află în amestec ambele tipuri de bacterii, în câmpul microscopic bacteriile Gram + apar colorate în violet, în timp ce bacteriile Gram - în culoarea contrastantă (roșie) a colorantului secundar.

Metoda de colorare diferențială Gram este o tehnică de bază folosită în practica de laborator pentru studiul bacteriilor și în scop de identificare a acestora. În tabelul 5 se prezintă etapele colorării dupa metoda Gram.

Tabel 5. **Metoda de diferenţiere Gram**

Reactivi	Durata de aplicare	Reacţii	Aspect celule
Frotiu fixat, necolorat	-	-	Celule fără culoare şi dificil de vizualizat
Cristal violet	1 minut, apoi clătire cu apă	Coloranţii bazici reacţionează cu grupe încărcate negativ din perete, membrana şi citosol	Atât bacteriile Gram pozitive cât şi cele Gram negative sunt colorate în violet închis
Soluţie Lugol (I_2/IK)	1 minut, apoi clătire cu apă	Iodul are efect de mordant şi măreşte ataşarea colorantului cristal violet la grupe încărcate negativ.	Ambele grupe de bacterii rămân colorate în violet închis
Alcool etilic 96° sau amestec de alcool etilic şi acetonă 1:1	10-15 secunde, apoi clătire cu apă	Solvenţii spală colorantul şi iodul din celule. Colorantul difuzează din celula bacteriilor Gram pozitive mult mai lent decât în cazul celor Gram negative, datorita compoziţiei chimice şi grosimii peretelui lor celular.	Bacteriile Gram pozitive rămân colorate în violet închis în timp ce bacteriile Gram negative devin incolore şi dificil de observat.
Safranină sau fucsină, colorant de contrast	1 minut; apoi clătire cu apă, zvântate în aer cald, studiu cu obiectiv 90x imersat în ulei de cedru	Colorantul bazic se fixează de grupele încarcate negativ din ambele tipuri de celule. La bacteriile Gram pozitive sunt însă puţine grupe libere de cristal violet comparativ cu cele Gram negative care sunt complet libere.	Celule Gram pozitive rămân colorate în violet închis (culoarea colorantului primar) în timp ce celulele Gram negative devin colorate în roz sau roşu (culoarea colorantului de contrast)

Structuri extraparietale. La unele bacterii în exteriorul peretelui celular se află o structură complexă de natură piloglucidică denumită **glicocalix,** care extinde suprafaţa celulei şi favorizează aderenţa bacteriilor la suprafaţa diverselor materiale, în condiţii naturale.

Diferitele tipuri de glicocalix pot aparţine următoarelor categorii:

- *Stratul S* -format din şiruri regulate de subunităţi glicoproteice şi *capsula* - formată dintr-o matrice fibroasă. Capsula poate fi rigidă, flexibilă sau

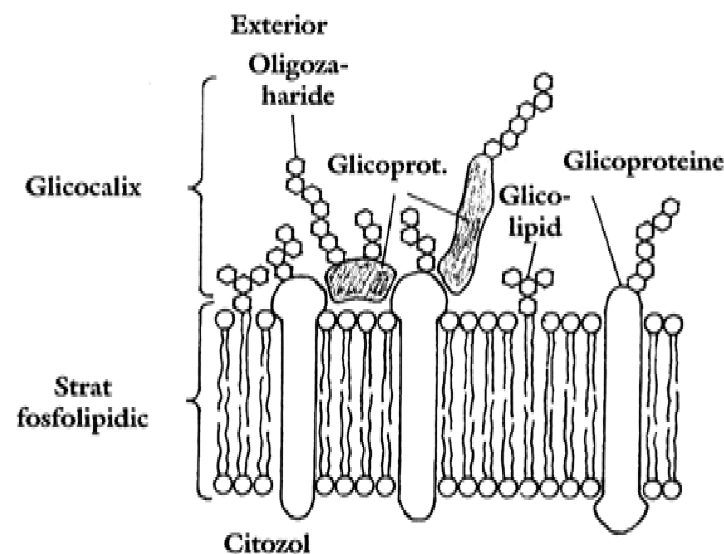


Fig 18. Diagrama glicocalix (Darnel)

integrată prin asociere cu suprafaţa periferică. În timp ce capsula este uniform repartizată pe suprafaţa celulei, stratul mucos se prezintă sub forma unei mase neorganizate de materie. La bacteriile acetice, de exemplu, stratul mucos leagă prin fibrile extracelulare mai multe celule şi poartă denumirea de ***masă zoogleică***.

Capsula şi stratul mucos sunt componente inerte rezultate din metabolismul celulei şi îi asigură protecţie la desicaţie, iar în cazul bacteriilor patogene le măreşte rezistenţa la acţiunea fagocitelor.

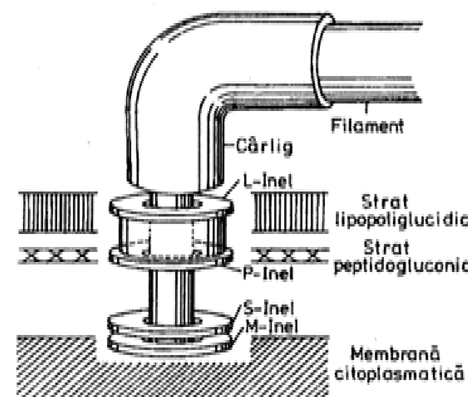


Fig. 19. Prezentarea schematică a cilului şi ancorarea în învelişul celular

Flagelii (cili) sunt organite de locomoţie prezente la bacteriile mobile. Acestea prezintă 40 de gene ce codifică compuşii implicaţi în sistemul flagelar şi de mobilitate. Se prezintă sub forma unor apendici filamentoşi, cu lungimea de 12-25μm. Flagelul prezinta un corp bazal, o articulaţie (cârlig) şi filamentul sub forma unui helix rigid format din flagelină. Bacteriile mobile pot să transforme energia chimică dată de curentul de protoni care

traversează membrana citoplasmatică, în lucru mecanic. Deplasarea celulei se produse prin învârtirea flagelului în jurul axului ca o elice, propulsând celula. Atunci când rotația se face în sens orar are loc rostogolirea celulei, rotația în sens antiorar duce la deplasarea bacteriei în linie dreaptă, cu o viteză de 20-90 μm/sec, ceea ce ar corespunde cu 2-100 lungimi de celulă/sec. Din punct de vedere energetic celula consumă pentru mobilitate aproximativ 0,1% din totalul de energie consumată pentru creștere (Cristopher,1991)

Numărul de flageli per celulă poate varia de la 1-100 și în funcție de repartizarea lor pe suprafața celulei, bacteriile mobile pot fi *monotriche* -cu un singur flagel, *amfitriche* -cu doi flageli la polii opuși a celulei, *lofotriche* când mai mulți flageli sunt amplasați la un singur pol, *peritriche* atunci când flagelii sunt repartizați uniform pe toată suprafața celulei.

Alte modalități de deplasare ale bacteriilor sunt: cea prin alunecare într-o direcție paralelă cu axul lung al celulei pe suporturi umede, prin *chimiotaxie* ca urmare a unor efecte provocate de existența unor concentrații inegale în nutrienți sau prin *fototaxie*, ca răspuns al unor bacterii fotosintetizante la stimulii luminoși.

Fimbrii (pili) sunt apendici pluricelulari sub forma unor tuburi subțiri din proteine aranjate helicoidal, cu diametrul de 3-10 nm și lungimi până la 1 μm. Au rol în atașarea bacteriilor (formarea de pelicule) și pot fi o cale de transport a cromozomului bacterian în conjugare (sex-pili) sau receptori ai unor virusuri.

Spinii -apendici rigizi (1-15/celulă) întâlniți la bacteriile Gram negative.

Caractere morfologice coloniale

Mediul de bază pentru cultivarea bacteriilor întâlnite pe produse alimentare și folosit în practică este bulionul de carne lichid sau solidificat cu agar-agar (BCA). Prin reproducere, dintr-o celulă de bacterie aflată pe mediu nutritiv solidificat ia naștere o *clonă* sau colonie, alcătuită din biomasa de celule rezultate prin sciziune din celula unică.

În cazul bacteriilor sunt întâlnite colonii aparținând următoarelor tipuri:

Colonii de tip S (smooth-neted lucios)

Colonii de tip R (rough-rugos, aspru, zbârcit)

Colonii de tip M -la bacterii producătoare de capsule, cu consistență gelatinoasă, mucoidă.

Clonele bacteriene pot prezenta în secțiune un profil lenticular, crateriform, triunghiular și perimetru circular, dantelat sau cu ramificații rizoidale.

Pe BCA coloniile devin vizibile după 24-48 ore și pot avea culori de alb, alb-crem. galben-auriu, oranj-roșu, albastru, fluorescență, caractere

microscopice importante în identificare. Prin cultivare în medii nutritive lichi bacteriile pot da tulburare și sediment, în cazul bacteriilor anaerobe/facult sau formează la suprafața lichidelor voal caracteristic, fragil sau cutat, gelatin (Bacterii aerobe)

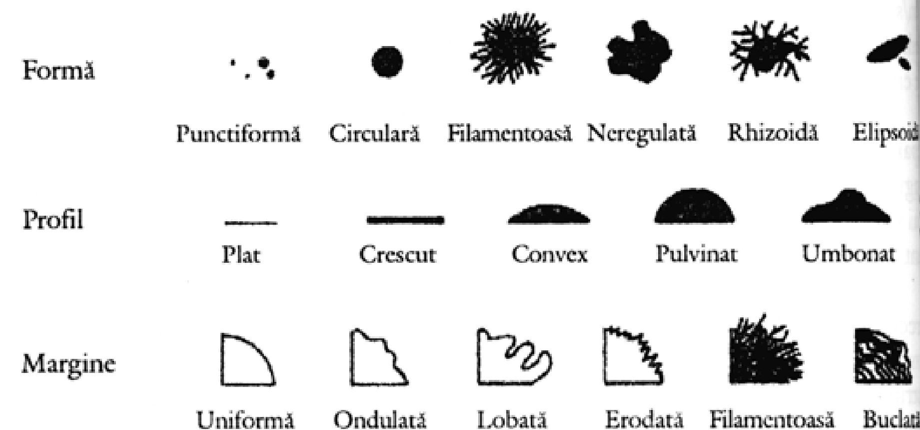


Fig.20. Caractere morfocoloniale ale bacteriilor

Caractere fiziologice generale ale bacteriilor

Bacteriile se caracterizează prin complexitate metabolică, cu o mare c pacitate de adaptare, răspândite pe cele mai diverse medii, ca urmare producerii de enzime care le permite utilizarea în nutriție a compușilor organi macromoleculari (protide, poliglucide, lipide). Bacteriile Gram pozitive diferențiază de cele Gram negative atât prin proprietăți tinctoriale cât și al proprietăți (Tab.7).

În raport cu temperatura, bacteriile se dezvoltă într-un domeniu lar între -10°C și +90°C; majoritatea bacteriilor agenți de alterare a alimentel sunt bacterii mezofile și dau alterări la temperatura camerei (bacterii putrefacție). Bacteriile în formă vegetativă sunt inactivate pe cale termică temperaturi de pasteurizare, iar sub formă de endospori, la temperaturi sterilizare.

În raport cu oxigenul majoritatea bacteriilor sunt aerobe (ex. bacte acetice), care cresc în semiaerobioză (ex. bacterii lactice), dar un grup restrâ de bacterii sunt adaptate să crească în strictă anaerobioză (ex. genul Clostridium

Bacteriile se pot dezvolta în domeniu de pH 1-11 cu zone optime valori acide pentru bacterii acidotolerante (bacterii acetice, lactice) sau la val neutre pentru bacterii de putrefacție.

Tabel 6. Diferențe între bacterii Gram pozitive și Gram negative

Proprietăți	Gram pozitive	Gram negative
Perete celular	Gros, aspect neted	Subțire, curat
Componența în aminoacizi în peretele celular	Număr mic	Număr mare
Endotoxine	Absențe	Prezente constant
Necesarul în nutrienți	Complex; la majoritatea speciilor	Cu unele excepții, mai puțin complex
Sensibilitatea la antibiotice	Relativ ridicată	Relativ scăzută
Efect de dizolvare în 1% KOH	Nu se dizolvă	Se dizolvă
Efectul detergenților anionici	Creștere oprită, celule lizate	Creștere încetinită, liză moderată
Liză cu lizozim	Ușor lizate	Mai rezistente la liză
Cristal violet-bacteriostatic	Mai sensibile	Puțin sensibile
Conținut în magneziu	Ridicat	Scăzut

(Anderson, D.A,1980)

Creșterea și reproducerea bacteriilor

În condiții favorabile de viață, în prezența mediului nutritiv, bacteriile reacționează rapid și are loc creșterea, proces prin care are loc mărirea coordonată a tuturor componentelor celulei, rezultată prin adăugarea de substanță nou formată prin biosinteză. Celula bacteriană are un raport foarte mare între suprafața prin care are loc pătrunderea nutrienților și volumul dat de componentele celulei în creștere. S-a stabilit că pentru un *coccus* cu diametrul de 1 μm raportul S/V este de 51000 iar pentru bacteria *Escherichiae coli* ajunge la 80000. (Valorile sunt foarte mari dacă se compară cu raportul existent la om, de aproximativ 0,342.)

În condiția în care are loc creșterea celulei bacteriene și se produce o modificare în raportul optim stabilit genetic, între suprafața care asimilează și volumul care acumulează, se declanșează reproducerea prin **sciziune binară izomorfă**, care va restabili raportul vital. În prima etapă odată cu biosinteza componenților celulari are loc replicarea cromozomului bacterian. Totodată are loc și dublarea numărului de mezozomi care vor lega moleculele de ADN și printr-un proces de cariochineză acestea vor fi deplasate spre polii celulei. În zona mediană începe biosinteza unui perete despărțitor încât celula parentală se regăsește în cele două celule rezultate prin sciziune, celule identice ca formă, dimensiune și structură genetică. În urma reproducerii celulele nou formate se pot separa sau pot rămâne asociate în direcția axei de sciziune, cu obținerea forme derivate.

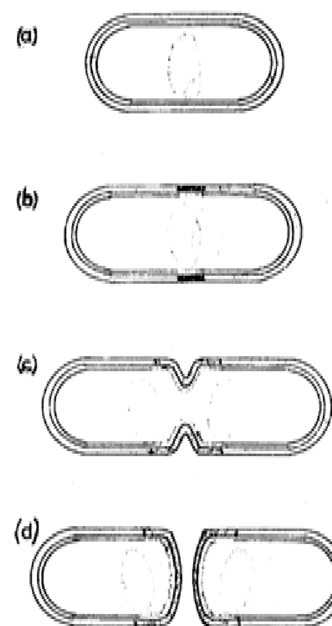


Fig.21. Diviziunea celulară la bacterii

La forma *coccus* prin sciziune într-un plan se formează *diplococi* și prin sciziune repetată se formează lanțuri de coci cu denumirea de *streptococi* (*g. Lactococcus, g. Leuconostoc, g. Streptococcus*). Dacă sciziunea are loc succesiv în două plane perpendiculare între ele rezultă prin asociere formațiuni cu câte patru coci denumite *tetrade* (g. *Pediococcus*). În cazul în care sciziunea are loc pe trei direcții perpendiculare se formează cuburi ce conțin opt coci cu denumirea de *sarcina* (*g. Sarcina*); formațiuni alcătuite din multipli de 8 coci poartă denumirea de *lampropedia*. La bacteriile din g. *Staphylococcus* în urma sciziunii în trei plane, neordonat, rezultă o formațiune în formă de strugure (limba greacă, staphylos) care dă numele genului. În cazul bacteriilor cilindrice sciziunea are loc într-un singur plan perpendicular pe axul longitudinal al celulei și pot rezulta ca forme asociate, diplobacterii și streptobacterii (*g. Lactobacterium*).

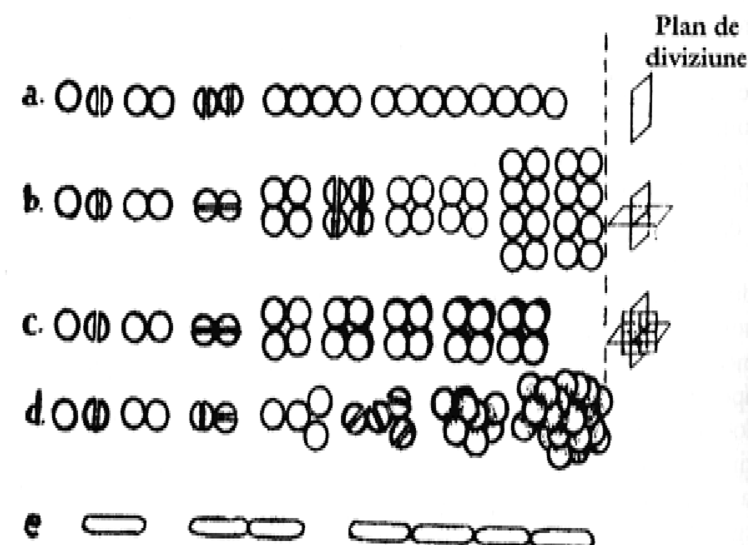


Fig.22. Forme bacteriene derivate prin sciziune

Parametri de creştere bacteriană

Prin sciziune binară numărul bacteriilor creşte în progresie geometrică: $2^0, 2^1, 2^2, 2^3,... 2^n$. În aceste condiţii: $N=N_0 . 2^n$

unde: N -număr de celule formate în urma creşterii determinat în momentul analizei;

N_0 - număr iniţial de celule; n - număr de diviziuni.

Prin logaritmare relaţia devine:

$lgN=lgN_0 + n\ lg_2$ şi se poate calcula numărul de diviziuni:

$$n=(lgN - lgN_0)/lg2$$

Numărul de diviziuni într-o oră sau constanta vitezei de diviziune se calculează cu formula:

$$v=n/t \text{ sau; } v= (lgN-lgN_0)/lg2(t-t_0)$$

Timpul necesar pentru un ciclu de diviziune sau **timpul de generaţie** - timpul între două diviziuni succesive, se calculează cu relaţia:

$$g=t/n \text{ sau: } g=1/v.$$

Deoarece o populaţie bacteriană este un sistem autocatalitic de reproducere, aceasta se desfăşoară după cinetica reacţiilor de prim ordin, în faza exponenţială constanta vitezei de creştere se determină cu relaţia:

$\mu=1/x.dx/dt$ prin integrare: $x=x_0e^{\mu t}$; $2x_0=x_0e^{\mu td}$ încât timpul de dublare $t_d=ln_2/\mu$ ($ln_2=0,693$)

Prin compararea constantei vitezei de creştere "μ"cu constanta vitezei de diviziune "v" se face observaţia că numărul de celule nu este identic cu biomasa de celule şi că în perioada creşterii într-o cultură periodică, corelaţia între aceşti doi indici se modifică. Dacă însă, determinarea numărului de celule şi apoi compararea cu masa uscată a acestui număr este strict proporţională cu mărirea numărului de celule considerate "celule standard" atunci

$$\mu=ln2.v \text{ şi } t_d=g. \text{ (Schlegel,19..)}$$

Capacitatea de sporogeneză a bacteriilor

Un grup restrâns de bacterii au dobândit în timp capacitatea exprimată genetic de a forma într-un anumit stadiu al ciclului lor de viaţă, o formaţiune intracelulară denumită *endospor* care asigură perpetuarea speciei datorită rezistenţei mari la temperaturi ridicate şi la lipsa de apă.

Printre bacteriile contaminate ale produselor alimentare se pot întâlni două mari grupe de bacterii:

- Bacterii în formă vegetativă care se reproduc numai prin sciziune şi sunt asporogene

- Bacterii sporogene care se pot întâlni fie în forma lor vegetativă, formă în care se reproduc prin sciziune până când în mediu apare un factor

defavorizant, de obicei epuizarea unu nutrient necesar şi este indusă cea d doua formă - respectiv forma sporulată.

Bacteriile sporgene incluse în clasificarea generală în familia *Bacillac* formează intracelular un singur endospor, de aceea sporularea este consider ca o formă de rezistenţă a celulei şi nu o formă de înmulţire.

Etape de formare a endosporilor

În ciclul de viaţă al unei bacterii sporogene, celula vegetativă în condiţi apariţiei unor factori defavorizanţi ai înmulţirii, suferă anumite transform direcţionate de cele peste 50 de gene care induc sporularea. Într-o primă eta are loc o concentrare a materialului citoplasmatic şi nuclear apoi în celu începe să se formeze un protoplast, iar membrana plasmică înconjoară celu sporală asigurând condiţii de protecţie şi creştere. În etapa următoare în jur celulei sporale se formează cortexul, apoi învelişul sporal propriu şi endospor matur poate fi pus în libertate prin liza (solubilizarea) peretelui celul sporogene. Edosporul eliberat, în condiţii favorabile germinea transformându-se din nou în celulă vegetativă, capabilă de reproducere pri sciziune binară.

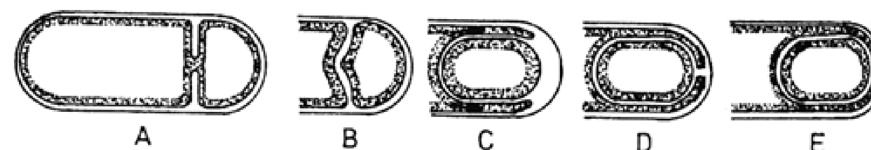


Fig. 23. Etape în formarea endosporilor

În funcţie de dimensiunile endosporului şi de localizarea sa în celula c forma bacterium, sporii bacterieni pot fi de trei tipuri:

- Tip bacillus -în care diametrul endosporului este apropiat cu al celulei, cu o poziţie centrală sau subterminală

- Tip clostridium -în care diametrul endosporului este mai mare decâ al celulei vegetative care în urma sporulării se deformează, cu forma de suveică atunci când poziţia este centrală sau de bec lumânare, atunci când endosporul este format terminal.

Structura şi proprietăţile endosporilor bacterieni. Cu ajutorul microscopului electronic s-a stabilit că endosporul prezintă un înveliş sporal tristratificat în compoziţia căruia au fost evidenţiate proteine cu un procent ridicat în aminoacizi cu sulf, care pot forma uşor legături disulfidice, cu rol în mărirea rezistenţei la denaturarea pe cale termică. Sub învelişul sporal se constată o zonă transparentă denumită **cortex**, de natură peptido-glucanică ce asigură o rezistenţă mecanică şi are rol important în reglarea presiunii osmotice, prin transferul apei libere din endospor spre exterior. Partea centrală a endosporului

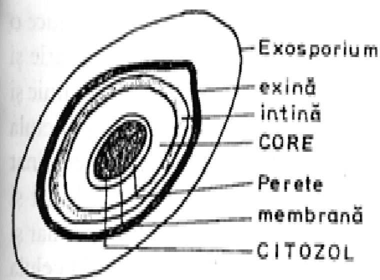


Fig.24. Structura endosporului bacterian

denumită *core* este formată din sporoplasmă, nucleoplasmă și un număr mare de ribozomi. În exteriorul endosporului se pot pune în evidență niște microtubuli ce pot menține endosporul într-o anumită poziție. Carcasa celulei vegetative în care s-a format endosporul poartă denumirea de *exosporium* și acesta poate rămâne atașat de endospor sau prin rupere/liză să îl elibereze în mediu.

Prin studiul microscopic al bacteriilor sporogene în frotiu, formele vegetative apar uniform colorate în timp ce la formele sporulate, endosporul este incolor, iar colorantul este prezent în exosporium. În endospor au loc importante modificări de compoziție și activitate metabolică comparativ cu celula vegetativă.

Din punct de vedere fizic endosporul ocupă 1/7 - 1/17 din volumul celulei vegetative iar masic aproximativ 1/3 din cea a celulei producătoare. În endospor cantitatea de apă se reduce de la 80% la valori de aproximativ 15%. Forma în care se găsește apa în endospor este cea de apă legată de diferite componente structurale, apă care nu favorizează reacțiile biochimice.

Datorită lipsei de apă liberă, enzimele sporale se află în stare inactivă iar din punct de vedere metabolic endosporul se află în stare de anabioză. În endospor este prezentă în concetrație ridicată o substanță specifică-acidul dipicolinic (10%/s.u.) care prin cele doua grupări carboxilice formează cu ușurință chelați cu ionii de calciu și magneziu. Se consideră că aceste modificări arhitecturale în structura sporoplasmei contribuie la proprietățile deosebite ale bacteriilor sporogene.

O proprietate remarcabilă este termorezistența: în timp ce celula sub formă vegetativă este inactivată termic la temperaturi de 80°C/1-5 min ca urmare a denaturării proteinelor/enzimelor din citosol, sub formă de endospori inactivarea poate avea loc la temperaturi de 120°C/10-20 min în mediu umed sau la 180°C/45-60min în mediu uscat. Termorezistența este explicabilă prin conținutul redus în apă, de prezența proteinelor cu sulf și a acidului dipicolinic, compuși care protejează în anumite limite enzimele sporale de o inactivare ireversibilă.

O altă proprietate importantă a endosporilor este rezistența la uscăciune, deoarece în stare de anabioză, enzimele deși în stare inactivă, își mențin calitatea de biocatalizatori un timp îndelungat, prelungind starea latentă de viață a celulelor sporale (zeci/sute de ani). În condiții favorabile sau prin reactivare,

(prin încălzire la 60°/10 minute), are loc **germinarea sporilor**. Se produce absorbție a apei are loc activarea enzimelor, crește activitatea de respirație fermentație și sunt eliminate substanțe specifice cum ar fi: acidul dipicolinic unele peptide. Se formează tuburi germinație în poziția polară și celul vegetativă rezultată are caracterele genotipice originare. Sporul care a germin nu este capabil de a începe imediat creșterea vegetativă. În mod ordonat succesiv are loc sinteza de ARN, protide, membrană celulară, perete celular ADN, cu o rată impusă pentru a avea loc modificarea de la endospor la celul vegetativă. Astfel sinteza ARN începe la intervalul de 2-5 minute dup germinare, sinteza protidelor după 4-15 minute și cea a ADN-ului după 30 120 minute.

Forme particulare de sporulare. În timp ce bacteriile (forma bacte rium) incluse în *g. Bacillus și g. Clostridium* formează endospori, bacteriil filamentoase - de *genul Streptomyces*, formează spori prin segmentarea hifelo din miceliul aerian, denumiți *arthrospori*, dar care nu prezintă proprietățil specifice endosporilor.

Bacterii ale solului, pot să producă transformarea întregii celule într-u *microchist* (g. Azotobacter), rezistent la uscăciune.

Unele actinomicete produc spori prin fragmentare (*g. Nocardia*) spor solitari (aleuriospori) sau spori în vezicule: *zoospori* mobili și *aplanospori* imobili

Sporularea reprezintă un caracter de specie, este o formă de diferenție celulară și trebuie privită ca o strategie de adaptare a procariotelor fiindc sporii sunt forme de rezistență care păstrează caracterele genetice ale celulei sporogene.

Clasificarea generală a bacteriilor

Clasificarea bacteriilor s-a realizat pe baza criteriilor morfologice și fiziologice încât pentru identificarea unei specii sunt uneori necesare 40 până la 100 de teste. Dintre criteriile morfologice mai importante sunt cele ce se referă la formele derivate prin sciziune care dau denumirea de gen.

Un criteriu de bază este afinitatea tinctorială a bacteriilor; familia ca unitate taxonomică conține același tip de bacterii: Gram pozitiv sau Gram negativ.

Dintre criteriile fiziologice se folosesc teste de asimilare sau fermentare a glucidelor, relația față de oxigen, temperatură, pH, rezistență la inhibitori ș.a.

Dintre datele ecologice se iau în considerație: habitatul, patogenitatea, sensibilitatea la bacteriofagi. În cazul bacteriilor patogene și facultativ patogene, pentru identificare se folosec reacții serologice deoarece aceste bacterii prin compoziția lor ajungând în circuitul sanguin îndeplinesc funcția de antigen

declanşând în organism reacţiile de apărare prin formarea de anticorpi specifici. Identificarea se face pe baza reacţiilor specifice între antigen-anticorp.

Clasificarea de bază folosită în prezent aparţine lui Bergey, în care bacteriile sunt grupate în 10 ordine şi 47 familii (1952); această clasificare este modificată în 1984 după criterii morfologice, prin care bacteriile sunt reîmpărţite în 33 de secţiuni. În continuare, în mod selectiv se vor trece în revistă principalele ordine, familii şi genuri cu importanţă practică.

Pentru anumite bacterii cu rol în industria alimentară se vor da detalii taxonomice în cadrul capitolelor de microbiologie specială.

În clasificarea generală a microorganismelor, bacteriile sunt incluse în regnul PROCARIOTE cu două diziviuni:

Diviziunea SCOTOBACTERIA - în care sunt cuprinse bacterii care folosesc pentru creştere şi multiplicare energia rezultată din reacţii chimice (bacterii chimiosintetizante).

Diviziunea PHOTOBACTERIA - cuprinde bacterii ce conţin pigmenţi similari clorofilei şi care pot folosi energia luminoasă în procese de biosinteză celulară.

În diviziunea Scotobacteria bacteriile sunt clasificate în trei clase:

A. Clasa BACTERIA - bacterii chimiosintetizante propriu-zise

B. Clasa ACTINOMYCES - bacterii filamentoase

C. Clasa MOLICUTES (Mycoplasma) - bacterii lipsite de perete celular, prezintă polimorfism, sunt bacterii patogene.

A. Clasa BACTERIA

I. Ordinul PSEUDOMONADALES - bacterii Gram-negative cu habitat în sol şi ape, aerobe, nesporulate.

1. Familia Pseudomonadaceae cu următoarele genuri:

Pseudomonas - bastonaşe tipice, răspândite pe produse vegetale, carne, pui, dau alterarea produselor refrigerate.

Acetobacter - bacterii acetice, produc oxidarea alcoolului etilic se folosesc la fabricarea acidului acetic de fermentaţie.

Xanthomonas - dau alterări ale legumelor, produc un polimer xanthan.

Zymomonas - bacterii care pot produce fermentarea glucidelor cu formarea de alcool; sunt folosite la obţinerea alcoolului carburant din materii celulozice.

2. Familia Nitrobacteriaceae, cu genurile *Nitrobacter şi g. Nitrosomonas* care produc oxidarea compuşilor cu azot rezultaţi din putrefacţie, cu transformarea azotului amoniacal în azotiţi şi azotaţi, formă asimilabilă de către plante.

3. Familia Thiobacteriaceae - produc oxidarea compuşilor cu sulf. Bacterii din genul *Thiobacillus* pot fi agenţi ai coroziunii biologice.

4. Familia Spirillaceae - produc degradarea celulozei în condiţii aerobe. Din genuri: *Cellvibrio, Cellfacicula, Cellulomonas*. Bacterii ale g. *Cellulomonas* su folosite pentru prelucrarea deşeurilor de hârtie pentru obţinerea de protei bacteriană folosită în scop furajer.

II. Ordinul EUBACTERIALES - cuprinde bacteriile propriu-zise, foa răspândite ce cuprind bacterii în formă de coccus, bacterium şi forme deriv prin sciziune.

1. Familia Achromobacteriaceae - bacterii nesporulate Gram negative, prod putrefactie

Achromobacter - produc prin degradarea protidelor, amine bioge toxice, sunt bacterii aerobe, produc alterarea produselor refrigerate.

Alcaligenes - produc reacţie alcalină în lapte litmus, sunt nepigmentat întâlnite în lapte, carne, pui, peşte şi materii fecale.

Flavobacterium - se prezintă sub formă de bastonaşe, produc un pi ment galben-roşu şi alterarea produselor la refrigerare.

2. Familia Azotobacteriaceae - bacterii care folosesc azotul atmosferic î nutriţie au rol în circuitul natural al azotului şi pentru obţinerea de îngrăşămint biologice - *Azotobacter chroococcum*.

3. Familia Bacillaceae - cuprinde bacterii sub formă de bastonaşe, Gram pozitive, producătoare de endospori.

Bacillus (25 specii) cuprinde bacterii de putrefacţie aerobe. unele speci selecţionate se folosesc pentru obţinerea de enzime: amilaze şi proteaze.

Clostridium (93 specii) - bacterii de putrefacţie anaerobe, producătoar de toxine, bacterii butirice, bacterii producătoare de solvenţi.

4. Familia Enterobacteriaceae - cuprinde bacterii Gram negative, nesporulate aerobe/facultativ anaerobe, patogene/facultativ, cu habitatul în tractul digestiv.

Escherichiae - bacterii de putrefacţie, facultativ patogene (agenţi ai gastroenteritelor) se pot înmulţi în produse alimentare, pot produce toxine. *E. coli* este folosit ca indicator sanitar pentru verificarea condiţiilor de igienă la fabricarea produselor alimentare.

Enterobacter - face parte din microbiota intestinală.

Erwinia - produc putrezirea umedă a legumelor.

Proteus - bacterii de putrefacţie mobile, aerobe, produc alterarea cărnii, ouălelor păstrate la temperatura camerei.

Salmonella - cuprinde bacterii patogene pentru om; se pot înmulţi în roduse alimentare şi să producă endotoxine încât prin consumul alimentelor ontaminate se produc toxiinfecţii alimentare.

Serratia - bacterii aerobe, produc pigmentare în roşu, predomină în roduse vegetale, carne refrigerată (*S. liquefaciens*).

Shigella - cuprinde bacterii enteropatogene (agentul dizenteriei).

5. Familia Lactobacillaceae - bacterii lactice Gram pozitive, nesporulate, facultativ anaerobe, sub formă de bacili (bastonaşe subţiri) sau sub forme derivate de la coccus. Caracterul fiziologic comun este capacitatea de a fermenta lactoza cu formare de acid lactic.

Streptococcus - cuprinde bacterii sub formă de streptococi. O parte din speciile genului au trecut în g. *Lactococcus* folosite drept culturi starter pentru industrializarea laptelui.

Lactobacillus - bacterii lactice acidotolerante, folosite în industria laptelui şi pentru conservarea prin murare a produselor vegetale.

Pediococcus - bacterii lactice sub formă de tetrade. Pot produce acrirea berii.

Leuconostoc - bacterii lactice heterofermentative, agenţi de alterare a sucurilor, siropurilor de zahăr ş.a. Pot produce biosinteza dextranului.

6. Familia Micrococcaceae - cuprinde bacterii Gram pozitive cu forma coccus sau forme derivate prin sciziune.

Micrococcus - bacterii aerobe/anaerobe, de putrefacţie.

Sarcina - bacterii aerobe de putrefacţie.

Staphylococcus - bacterii facultativ patogene; produc enterotoxine şi sunt agenţi ai intoxicaţiilor alimentare.

7. Familia Propionibacteriaceae - bacterii nesporulate Gram pozitive, produc fermentaţia propionică.

Propionibacterium - bacterii folosite la fabricarea brânzeturilor şi pentru obţinerea vitaminei B_{12}.

B. CLASA ACTINOMYCES

I. Ordinul ACTINOMYCETALES - cuprinde bacterii filamentoase, Gram pozitive, saprofite sau facultativ patogene, folosite industrial pentru obţinerea de substanţe biologic active.

1. Familia Mycobacteriaceae - cuprinde bacterii patogene. În genul *Mycobacterium* - *M. tuberculosis* (agentul tuberculozei) şi *M. leprae*.

2. Familia Actinomycetaceae - bacterii patogene pentru animale/plante. Au rol în formarea humusului şi la închiderea la culoarre a solului.

3. Familia Streptomycetaceae - bacterii filamentoase. În g. **Streptomyces** numeroase specii sunt folosite pentru obţinere de antibiotice (tetracicline, streptomicina, cloramfenicol ş.a.) sau pentru enzime (glucozizomeraze).

II. Ordinul RICKETSIALES - cuprinde bacterii obligat parazite ale insectelor, transmisibile prin înţepături la animale şi om.

Ricketsia - cu sp. *R. prowazecki* - agent al tifosului eczantematic.

Coxiella - bacterii patogene, produc febra Q-hemoragică. *C. bruneti* se poate transmite prin lapte.

3.4. VIRUSURI

Virusurile sau inframicrobii sunt agenţi infecţioşi fără organizare celular reprezintă entităţi corpusculare ce includ acizii nucleici purtători ai informaţi genetice şi parazitează obligatoriu celule vii.

Principalele caractere care le diferenţiază de celelalte microorganism sunt următoarele:

- absenţa organizării structurale şi funcţionale a celulelor, de aceea nu cresc în dimensiuni, nu se divid, nu au metabolism propriu,

- majoritatea virusurilor nu conţin în acelaşi timp ambele molecule de acizi nucleici, de aceea au fost clasificate in adenovirusuri (ADN) şi ribovirusu (ARN).

- virusurile sunt adaptate de a se reproduce în celula vie (eucariot procariotă), ca rezultat al transmiterii informaţiei genetice proprii, celul parazitare.

Istoric. Virusurile au fost puse în evidenţa de către D. Ivanovski î 1882 care a constatat că lichidul separat prin filtrul ce reţinea bacteriile, m prezenta infecţiozitate. În 1915, Twort pune în evidenţă bacteriofagii începând din 1930 apar primele studii de morfologie virală.

Răspândire şi rol. Se consideră că virusurile au apărut odată cu prime forme de viaţă şi există teorii care explică geneza lor. Virusurile au putut proven din celule procariote care au devenit parazite sau ca rezultat al formării d acizi nucleici cu structură complexă, ce au devenit independenţi funcţionând prin parazitare.

Bolile virale sunt cunoscute de foarte mult timp şi istoria omenirii est marcată de diferite epidemii virale care au dus uneori la dispariţia unor popoare. Astfel variola a produs mii de victime în anii 100-300 î.e.n.; aztecii ca şi indienii americani au fost decimaţi de bolile virale aduse de europeni. Dintre boli virale ale omului şi animalelor mai fac parte: turbarea, poliomielita, gripa, hepatita, forme de cancer, SIDA ş.a. iar la plante, diferite viroze produc ofilire frunzelor, atrofii/hipertrofii, cloroza ş.a. (numai la plantele cerealiere se cunosc 25 boli virale).

Virusuri denumiţi şi fagi pot produce parazitarea microorganismelor (bacteriofagi, micofagi).

Bolile virale se transmit uşor prin contact infecţios, prin leziuni sau prin inoculări (injectare, înţepături ale insectelor transportoare de virusuri). Prin alimente, prin materii prime de origine animală provenite de la animale bolnave de viroze se pot transmite şi pe cale digestivă virusuri ce dau hepatita, poliomielita, herpesul ş.a.

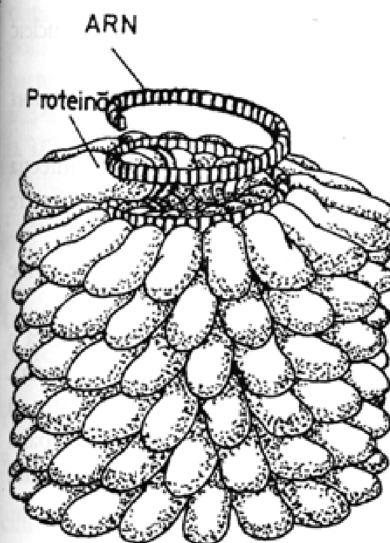


Fig. 25. Structură virală

Caractere morfologice

O particolă virală este alcătuită din *genom* - respectiv o moleculă de acid nucleic mono sau bicatenar, cu diferite forme de compactizare. În genomul virusurilor animale și la bacteriofagi este prezent ADN în timp ce la virusurile vegetale ARN. Acidul nucleic este înconjurat cu unități proteice denumite *protomere*, cu o repartizare ordonată (capsomere) și rol în protecția genomului, a formei și în recepție de către celulele ce urmează a fi parazitate.

Acidul nucleic și moleculele proteice asociate alcătuiesc *nucleocapsida*, cu diferite forme geometrice (cubică, icosaedrică ș.a.).

Masa moleculară a virusurilor este de 100 - 120 KDa, iar 50% din aceasta este dată de acidul nucleic. La unele virusuri mari poate fi prezentă o pseudomembrană denumită *peplos*, la suprafața căreia sunt integrate molecule de proteine/enzime care favorizează pătrunderea particolei virale, în celula agresată.

Virusurile sunt sensibile la diferiți factori ale mediului; astfel pot fi inactivate pe cale termică la temperaturi de 60-80°C/30 minute, în schimb rezistă la temperaturi negative și pot fi conservate prin congelare. Pe cale chimică inactivarea virusurilor poate fi făcută cu alcooli, detergenți, formol ș.a., în schimb au rezistență la antibiotice.

Ciclul vital al virusurilor

În replicarea virală se pot distinge mai multe etape:

- **adsorbția**, când are loc contactul infecțios, particola virală găsește locusul receptor pe suprafața celulei și are loc adsorbția specifică
- **înglobarea** (pătrunderea) este posibilă prin transport sau endocitoză
- **decapsidarea**, constă în separarea moleculelor capsomere și eliberarea acidului nucleic
- **replicarea**, etapă ce are loc după decapsidare când acidul nucleic viral impune celulei parazitate biosinteza proteinelor "timpurii" și sunt create prin biosinteză, componentele necesare ce alcătuiesc matrița pentru biosinteza a noi molecule de acid nucleic viral; urmează biosinteza proteinelor "tardive" care intră în structura capsidei.

- **morfogeneza**, etapa de asamblare prin care moleculele de acid nucleic viral sunt înconjurate de unitățile protomere.
- **eliberarea particolei virale** se poate face prin: exocitoză, transport prin locusuri ale celulei, sau prin liza peretelui celulei parazitate.

Particolele virale mature (denumite virioni), pot să continue infecția celulelor adiacente din țesutul viu și are loc fie distrugerea acestuia, fie o creștere anarhică, anormală ce conduce la formarea tumorilor.

Procesul de infecție se oprește când țesutul este distrus sau când intervine un factor de inhibare a ciclului litic viral.

Un succes al biotehnologiei este obținerea prin inginerie genetică a interferonului, substanță care inhibă adsorbția și transmiterea unor virusuri. Unele virusuri pot avea concomitent un ciclu lizogenic, având capacitatea să se integreze în cromozomul celulei atacate, care se va reproduce normal, până când un factor favorizant va elibera nucleul vital ce va induce etapele ciclului litic.

FAGII

Sunt virusuri care parazitează celulele microbiene și în funcție de natura celulei parazitate, se cunosc bacteriofagii și micofagii.

BACTERIOFAGII

Sunt virusuri adaptate să paraziteze celula procariotă și au fost puși în evidență de către F. Twort (1915) și d'Herelle (1917).

Răspândire și rol. Bacteriofagii pot face parte din microbiota intestinală și se elimină prin materii de dejecție. În condiții naturale, bacteriofagii au un rol ecologic important, ca agenți de depoluare a apelor fecalo-menajere.

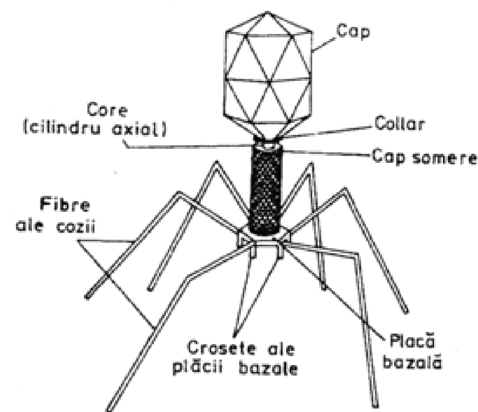


Fig. 26. Structura bacteriofagului

În industria alimentară bacteriofagii pot contamina și distruge culturi de bacterii lactice. Din acest motiv sunt folosite culturi starter lizorezistente. În ingineria genetică bacteriofagii sunt folosiți pentru transfer de gene și obținerea de tulpini bacteriene modificate genetic.

Structura. Bacteriofagii sunt formați dintr-o capsidă cu contur hexagonal, care închide genomul. În interiorul capului hexagonal se află

o moleculă de ADN-dublu catenar, împachetată în molecule de proteine și poliamine. În continuarea capului se află un disc și un cilindru axial (coada bacterio–fagului), gol în interior, alcătuit din 24 inele - capsomere. Acestea alcă–tuiesc teaca contractilă a cozii, deoarece prin contracție își reduc lungimea la 1/2. Cilindrul axial se termină cu o placă bazală prevăzută cu un orificiu central și cu 6 croșete - unități de fixare a bacteriofagului pe celula bacteriană receptivă.

Infecția cu bacteriofag are loc în următoarele etape:

- **Adsorbția**, se produce prin ciocniri întâmplătoare ale bacteriofagilc cu celulele bacteriene până când aceștia ajung pe un situs receptor al peretelı bacterian (de ex. acizii teichoici la Gram+, lipopoliglucide la Gram -).

- **Fixarea** se realizează cu ajutorul croșetelor din placa bazală și au lc modificări catalizate enzimatic care conduc la solubilizarea în zona de contac a peretelui celular.

- **Injectarea**. Se produce o contractare a capsomerelor aflate pe tij cilindrului axial, prin contracție tija pătrunde în celulă pe o distanță de apro: 12 nm și molecula de ADN în stare relaxată este propulsată în interiorul celule Carcasa liberă de acid nucleic rămâne în exteriorul bacteriei.

- **Replicarea** acidului nucleic are loc similar cu a celorlalte virusuri, c deosebire că, formarea capului, a cozii, are loc separat și apoi are loc morfogeneza, intracelular.

- **Liza celulei bacteriene și eliberarea fagilor** poate avea loc într-un interval de 25-60 minute și se produce sub acțiunea unei enzime induse de prezența fagului, denumită mura–midaza și sub acțiunea presiunii in–terne și lizei are loc ruperea/solubi–lizarea peretelui celular. Sunt sensibile la fagi bacterii ale genurilor; *Entero–bacter, Pseudomonas, Bacillus, Vibrio, Lactobacillus ș.a.*

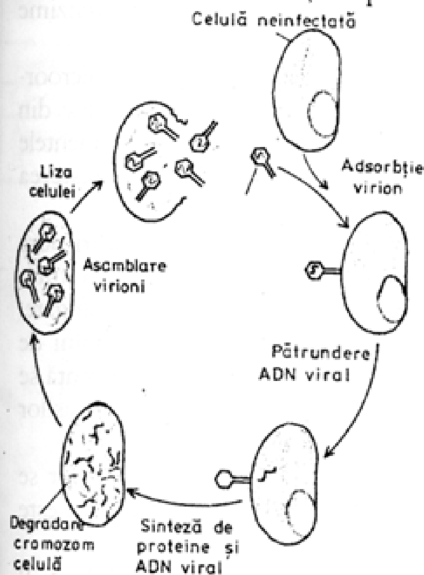


Fig. 27. Ciclul viral

În celulele lizogene se pot întâlni forme de profagi care în condiții favo–rabile devin virulenți.

MICOVIRUSURILE

Sunt mai puțin studiate compa–rativ cu bacteriofagii. Au în structură ARN și pot parazita fungi apar–ținând genurilor: *Penicillium, Aspergillus, Mucor, Fusarium, Saccharomyces cerevisiae ș.a.* (Zarnea, 1990)

CAPITOLUL 4
COMPOZIȚIA CHIMICĂ A MICROORGANISMELOR

Microorganismele în funcție de natura lor și condițiile de cultivare au compoziție chimică diversificată în care intră aceleași elemente biogene întâlnit și în celelalte forme de viață, formând structuri similare sau strict specifice ș demonstrează materialitatea lumii.

Celula microbiană poate fi privită ca o fabrică biochimică miniaturală dar autonomă, în care în mod continuu se prelucrează substanțele nutritive se sintetizează noi substanțe necesare pentru viață și se elimină substanțele inu-tile.

Cunoașterea compoziției chimice a celulelor microbiene prezintă interes practic, deoarece permite folosirea anumitor substanțe valoroase, sintetizate intracelular prin consumul integral celulelor inactivate în alimentație. De exemplu: drojdiile furajere, biomasă proteică fungică (SCEP -Single cell en-capsulated protein), reziduri ale industriei alimentare fermentate îmbogățite în proteine, aminoacizi (lizină) lipide, vitamine.

Din biomasa microbiană recoltată după cultivare în medii lichide, se pot obține extracte, plasmolizate sau compuși în stare purificată (enzime intracelulare, vitamine, proteine, pigmenți).

În același timp cunoașterea compoziției chimice a unui tip de microor-ganism este necesară pentru asigurarea condițiilor de cultivare optime din punct de vedere nutrițional, încât mediul de cultură să conțină toate elementele necesare și într-o formă accesibilă pentru înmulțirea rapidă și creșterea randamentului în biomasă.

Pentru studiul compoziției chimice, microorganismele în culturi pure sunt cultivate în mediu nutritiv 24-48 ore în condiții adecvate de temperatură, pH, aerare ș.a. după care se face separarea celulelor prin filtrare sau centrifugare. Se face spălarea repetată pentru îndepărtarea componentelor mediului de cultivare și se obține biomasa umedă. Prin uscare până la masă constantă se determină conținutul de apă, iar în biomasa uscată se face analiza compușilor organici și anorganici.

Prin studiul compoziției chimice elementare a microorganismelor se constată că aproximativ 95% din substanța uscată a celulelor microbiene este alcătuită din două mari grupe de elemente;

- **macroelementele**, denumite și elemente universale: C, H, O, N, S, P care intră în compoziția substanțelor organice și se găsesc în compoziția tuturor

organismelor vii; de asemenea în această grupă mai intră Na, K, și Fe, necesare în cantități mari la unele microorganisme specifice.

- **elementele minore** în cantități de ordinul microgramelor din care fac parte: Cu, Mg, Zn, Co ș.a. Dintre acestea Mg are un rol important în creșterea termorezistenței endosporilor bacterieni, Co intră în componența vitaminei B_{12}.

Tabel 6. Compoziția elementară aproximativă a celulei microbiene

Elemente	g% su	Funcții fiziologice ale elementelor
Carbon	50	Constituient al compușilor organici celulari
Oxigen	20	În structura apei, a materiei organice, ca O_2 acceptor de electroni în respirația aerobilor
Azot	14	Constituient al proteinelor, acizi nucleici, coenzime
Hidrogen	8	În materie organică, în apa celulară
Fosfor	3	În acizi nucleici, fosfolipide, coenzime
Sulf	1	În compoziția aminoacizilor cu sulf, CoA, cocarboxilază
Potasiu	1	Cation anorganic principal, cofactor enzimatic
Magneziu	0,5	Cofactor anorganic pentru multe reacții enzimatice
Calciu	0,5	Cation celular important, cofactor pentruenzime (proteinaze, a-amilază)
Fier	0,2	Constituient al citocromilor și a unor proteine, cofactor
Sodiu	1	Cation anorganic principal
Clor	0,5	Co-constituient al vitaminei B_{12}
Alte elemente (Cu, Zn, Co)	0,3	Constituienți ai unor enzime

(Y. Stanier 1977)

4.1. ROLUL APEI ÎN CELULA MICROBIANĂ

Prin analize de compoziție s-a stabilit că bacteriile conțin apă în proporție de 61-85% iar drojdia de panificație 67-70% . Cantitatea mare de apă în celulele microbiene se justifică prin rolul acesteia în viața celulei. Apa reprezintă în mediul în care se solubilizează diferitele substanțe necesare nutriției, în care au loc reacțiile enzimatice, încât viața celulei nu este posibilă în absența apei libere. Apa în celula microbiană poate fi întâlnită sub două forme: apă liberă, apă folosită de către celula vie pentru desfășurarea normală a metabolismului și apă legată de compuși organici: protide, acizi nucleici, fosfolipide, sub forma

unor straturi de molecule de apă cu rol în funcționarea macromoleculel organice.

Apa celulară este un sistem dinamic interacționând puternic cu gru de tipul C-H; CH-NH, formând între molecule organice, legături de hidroge Energia legăturilor de hidrogen egală cu 88,89.10^3 J/mol este mai mică dec energia legăturilor covalente între O^2 și H (377.10^3 J/mol, în schimb este m mare decât puterea de dispersie și de inducere a dipolilor. Datorită formăr învelișului hidratat prin care moleculele de apă ecranează moleculele încărca cu sarcină negativă, crește stabilizarea în medii de dispersie și asigur funcționarea macromoleculelor în sistemele vii: De exemplu 1g de protein leagă 0,1-0,6g de apă, iar acidul dezoxiribonucleic leagă 3 moli de apă l fiecare nucleotid, alcătuind un strat de hidratare de 0,45g/g acizi nucleic legăturile de hidrogen stabilizând structura dublă spiralată a ADN-ului. U mol de fosfolipide leagă 12 moli de apă, încât 1g de lipide poate reține 0,3 apă legată, apă care nu îngheață, se îndepărtează greu la uscare și nu es solvent pentru alte substanțe. Apa liberă, ca dielectric solubilizează sărurile anorganice și le disociază în ioni; solubilizează de asemenea alcooli alifatici acizi, multe substanțe heterociclice aromatice ș.a., participând în procese d hidroliză, respirație, nutriție. (Konovalov, S.A, 1980)

În condiții extreme prin care se îndepărtează apa intracelulară (evaporare osmoză, congelare) prin pierderea apei libere, celula trece în stare de anabioză

Termenul de anabioză descrie starea de viață latentă a celulei când activitatea metabolică nu poate fi măsurată, ca urmare a trecerii enzimelor într-o stare inactivă. În funcție de procesul care conduce la instalarea anabiozei se folosește următoarea terminologie:

- **Anhidrobioza** -stare provocată de pierderea unei cantități mari de apă, prin evaporare
- **Osmobioza** -starea care apare prin eliminarea apei cu ajutorul soluțiilor (de sare/zahăr) care au o presiune osmotică ridicată
- **Criobioza** -când are loc congelarea celulelor vii și cristalizarea apei libere

(O stare particulară este anoxibioza care se instalează la micșorarea concentrației de oxigen în aer, sub nivelul necesar pentru susținerea metabolismului oxidativ).

Anabioza este o stare reversibilă a sistemelor biologice care își păstrează energie suficientă pentu reactivare, când apa devine disponibilă (Fig.28).

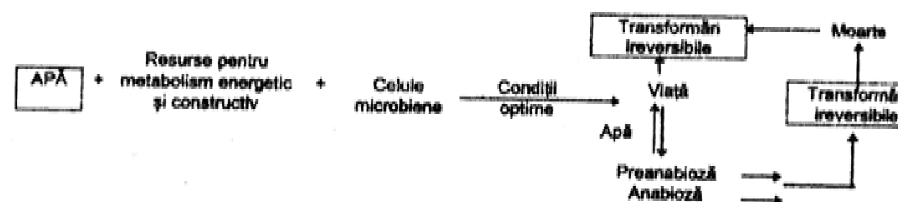


Fig.28. Interacțiunea între anabioză și viață (Becher M.E, 1981)

Pentru explicarea modificărilor fiziologice și biochimice pe care le suferă celulele în stare de anabioză s-au emis următoarele ipoteze:

- În timpul deshidratării pot fi distruse structuri macromoleculare încât pentru a reveni la starea activă normală este necesar un timp pentru reparare. Dacă deshidratarea celulei are loc până la umidități de 6-10%, prin îndepărtarea unei părți din apa legată, poate avea loc o dezorientare a lipidelor din componența membranelor. Ca rezultat al slăbirii interacțiunilor hidrofobice la deshidratare au loc dereglări în funcționalitatea biomembranelor, procese de peroxidare, efecte de șoc ș.a.

Majoritatea reacțiilor chimice și enzimatice se pot realiza numai în prezența apei libere, la un conținut ce trebuie să depășească 15-20%. Prin deshidratare la 1-10% umiditate se pot produce modificări structurale ireversibile încât numărul de celule viabile variază în limite foarte largi de la 90-99% pâna la 0,001%.

În perioada de anabioză pot fi utilizați unii metaboliți intermediari și e necesară resinteza lor înainte de a fi restabilită activitatea normală.

Rehidratarea celulelor bacteriene are loc în interval de câteva secunde la 5-15 minute, după care populația intră în faza de dezvoltare, are loc biosinteza de noi molecule în locul celor degradate, care sunt izolate sau reparate, ceea ce face ca faza de adaptare pentru restabilirea stării fiziologice normale să se prelungească.

Biomasa celulară obținută după îndepărtarea apei, respectiv substanță uscată, este formată din compuși organici și anorganici (cenușă - rezultată prin mineralizare).

4.2. COMPUȘI ORGANICI

Raportați la % subtanță uscată, compușii organici reprezintă 86-98% și îndeplinesc în celula microbiană trei roluri de bază:

- Rol structural, intrând în compoziția învelișurilor celulare; sunt de natura hidraților de carbon, ca de exemplu: glucani, manani, celuloze.

- Rol funcțional, participând activ la desfășurarea proceselor metabolice, ca de exemplu: protide cu funcții enzimatice, vitamine cu rol de coeziune, unele fosfolipide ș.a.

- Rol energetic, prin acumularea intracelulară a compușilor de rezervă de natură glucidică: trehaloza, glicogenul și incluzii lipidice.

În tabelul 7 se dau valori pentru compușii organici întâlniți în principalele grupe de microorganisme

Tabel 7. Compuși organici în % ai principalelor grupe de microorganisme

Grupe microorganisme	Protide	Lipide	Acizi nucleici
Drojdii	45-55	1-6	4-10
Mucegaiuri	10-25	1-7	1-3
Bacterii	40-50	10-15	13-25
Virusuri	50-90	1-5	5-50

Dintre compușii organici, substanțele de natură glucidică reprezintă 16-40% și sunt întâlnite în structura pereților celulari (glucani, manani, celuloze) sau în structuri extraparietale ale bacteriilor (dextran la *Leuconostoc mesenteroides*, xanthan la g. *Xanthomonas*, acetat de celuloză la g. *Acetobacter*, fosfomanani la drojdii). Glucidele simple nu se întâlnesc în stare liberă, fiind ușor metabolizate, dar intră ca unități de bază în structura poliglucidelor sau a acizilor nucleici (riboza, deoxiriboza). În celule de drojdii și mucegaiuri se acumulează în faza activă de creștere, trehaloza, glicogenul, iar la bacterii -granuloza, substanțe ce pot fi consumate de celule în condiții de înfometare. Unele mucegaiuri pot produce după ce a avut loc faza activă de creștere, substanțe toxice -micotoxine de natură hidrocarbonată.

Un alt grup important de compuși organici îl formează protidele, cu procente de 50-55% din biomasa uscată. Structura lor este similară cu cea întâlnită în produse de origine vegetală sau animală sau pot să prezinte caractere specifice (ex.mucorine la mucegaiurile inferioare). În general protidele microbiene au o compoziție echilibrată în aminoacizii esențiali; spre deosebire de protidele de origine animală acestea conțin o concentrație mai redusă în aminoacizii cu sulf - metionină și cisteină, iar spre deosebire de protidele vegetale conțin mai multă lizină și triptofan. Datorită conținutului ridicat de protide,biomasa microbiană (după uscare și inactivarea celulelor) se poate folosi în nutriția animalelor sau a obținerii după purificare a proteinelor din monocelulare folosite ca aditivi alimentari.

În celula microbiană numeroase protide îndeplinesc funcții de biocatalizatori: enzimele pot fi constitutive - mereu prezente în celula vie, și enzime adaptive (induse), endogene sau exogene sintetizate ca urmare a adaptării metabolismului la noi condiții de mediu. Din totalul proteinelor celulare 1/3 îl formează nucleoproteidele ce intră în structura materialului nuclear/nucleu. Unele bacterii pot produce protide cu efect toxic -ca de exemplu toxina butulinică produsă de *Clostridium botulinum*, enterotoxine produse de bacterii ale g. *Staphylococcus*, endotoxine produse de g. *Salmonella* ș.a.

Alţi compuşi celulari -**lipidele**, intră în structura membranelor, a incluziunilor libere sau asociate cu compuşi macromoleculari -poliglucide sau protide. Unele drojdii ale g. *Rhodotorula* ca şi mucegaiuri ale g. *Aspergillus, Fusarium, Geotrichum*, în funcţii de condiţii de cultivare pot acumula intracelular 20-35% lipide cu o compoziţie valoroasă. Dintre lipide complexe: ceruri, fosfolipide, acid micolic.

În celula microbiană sunt întâlnite numeroase **vitamine** dintre care predomină vitamine din grupul B (B_1, B_2, B_{12}), ergosterol (provitamină D_2) ß -caroten (provitamina A) ş.a încât microorganismele selecţionate sunt folosite pentru obţinerea pe cale industrială a acestora.

Un mare grup de compuşi îl formează **pigmenţii** care dau colorarea caracteristică a coloniilor, cu rol de protecţie faţă de acţiunea unor radiaţii sau cu rol funcţional în cazul în care participă la obţinerea de energie prin procesul de fotosinteză. Au fost identificaţi pigmenţi caratenoidici (la g.Rhodotorula, g.*Monascus*, g. *Blakeslea*); antocianici (g.*Actinomyces*), melanici (g. *Azotobacter*) fenazinici (g. *Pseudomonas*) ş.a.

4.3. COMPUŞI ANORGANICI

În compoziţia cenuşii rezultate prin incinerarea biomasei uscate în cantitate de 2-14%, în concentraţii mari se găsesc oxizii de fosfor, aproximativ 50%, deoarece fosforul intră în structura acizilor nucleici, a acizilor adenilici, a fosfolipidelor şi a fosfoprotidelor. În concentraţii mai mici se întâlnesc oxizii de sodiu, potasiu şi oxizi ai elementelor minore.

În tabelul 8 se dau corelaţii între numărul de celule şi cantitatea de biomasă

Tabel 8. Corelaţii între numărul de celule şi biomasă celulară

Grupe de microorganisme	Număr de celule	Masa în grame
Drojdii	$2 \cdot 10^{13}$	2,9
Mucegaiuri superioare	10^8-$4 \cdot 10^8$	1-5
Bacterii	$2 \cdot 10^{16}$	0,02
Virusuri	10^{11}	0,0005

Cunoaşterea compoziţiei specifice a diverselor microorganisme este importantă în cultivarea microorganismelor cu importanţă industrială deoarece diversele elemente care intră în compoziţie trebuiesc asigurate în mediu pentru ca celula să aibă la dispoziţie elementele necesare pentru activitate fiziologică. Un alt aspect îl reprezintă valoarea deosebită a unor compuşi microbieni intracelulari care se pot obţine avantajos pe diverse căi biotehnologice.

CAPITOLUL 5
NUTRIŢIA MICROORGANISMELOR

Nutriţia este un proces fiziologic complex prin care microorganismele îşi procură elementele necesare şi energia pentru biosinteza compuşilor celulari, pentru creştere, reproducere şi întreţinerea funcţiilor vitale.

Procesul de nutriţie se desfăşoară în cadrul metabolismului celular prin reacţii de degradare a compuşilor macromoleculari în compuşi cu masă moleculară redusă, ce pot fi transportaţi în interiorul celulei, reacţii exergonice ce au loc în cadrul catabolismului celular. Concomitent cu reacţiile de catabolism, folosind compuşii simpli şi energie, celula vie sintetizează compuşii celulari esenţiali pentru creştere, în cadrul anabolismului. Viaţa celulei microbiene este posibilă atât timp cât cele două procese se desfăşoară concomitent.

Analiza compoziţiei celulei microbiene arată că 95% sau mai mult din subtanţa uscată este alcătuită din câteva elemente majore: carbon, oxigen, hidrogen, azot, sulf fosfor, potasiu, calciu, magneziu şi fier. Aceste 10 elemente principale mai sunt denumite macroelemente deoarece sunt cerute de microorganisme în cantităţi mari, în concentraţii mai mari de 10^{-4}M.

Primele şase elemente (C,O,H,N,S,şi P) sunt componente ale glucidelor, lipidelor, protidelor şi acizilor nucleici. În timp ce C,O,H,N sunt componente de bază ale principalelor combinaţii organice, sulful este necesar pentru sinteza aminoacizilor: menţionăm cisteina şi în unele coenzime, iar fosforul intră în compoziţia nucleotidelor ATP, GTP, NAD, FAD, în acizi nucleici (ADN, ARN), a acizilor teichoici şi a fosfolipidelor. Celelalte 4 elemente (K, Ca, Mg, Fe) există în celule sub formă de cationi şi au un rol bine definit. Potasiul (K^+) este necesar pentru activitatea numeroaselor enzime inclusiv a celor implicate în biosinteza de proteine. Calciul (Ca^{2+})printre alte funcţii contribuie la creşterea termorezistenţei endosporilor bacterieni (dipicolinat de Calciu) şi ca stabilizator al unor exoenzime (amilaze şi proteaze). Majoritatea esterilor fosforici se găsesc în complex cu Mg. Fosfolipidele peretelui celular bacterian, formează combinaţii chelatice cu ioni de Mg^{2+}. De asemenea Mg are rol de cofactor pentru multe enzime şi este stabilizator pentru ribozomi şi membrane celulare.

Fierul (Fe^{2+} şi Fe^{3+}) sunt folosiţi în sinteza de citocromi şi drept cofactor pentru enzime şi proteine transportatoare de electroni.

Pe lângă bioelementele principale, toate microorganismele necesită un număr variabil de bioelemente minore denumite şi microelemente sau micronutrienţi. Majoritatea celulelor necesită mangan, zinc, cobalt, molibden,

- **Chemoorganotrofe heterotrofe** își obțin energia pe cale chimică pri procese de oxidare a compușilor organici și procură oxigenul și hidrogen din compuși organici și anorganici. (Fungi și bacterii)
- **Photolitotrofe autotrofe** (alge, bacterii din ape) folosesc energ luminoasă în procese de biosinteză și folosesc sursa de carbon, hidrogen oxigen din compuși anorganici.
- **Photolitotrofe heterotrofe** folosesc energia luminoasă iar ca sur majoră de carbon, dioxidul de carbon din aer. (bacterii sulfuroase)
- **Chimiolitotrofe autotrofe** (sulfobacterii, ferobacterii) își obțin energ pe cale chimică iar ca sursă de carbon, hidrogen, servesc compușii anorganic

Microorganismele cu rol în industria alimentară, (drojdii, mucegaiuri bacterii) aparțin primului tip nutrițional. Fiind adaptate să se dezvolte prin asimilarea carbonului din materie organică sunt cunoscute ca agenți selecționați pentru dirijarea proceselor fermentative industriale, ca agenți de alterare, sau patogeni.

În grupa *microorganismelor organotrofe* se disting următoarele subgrupe:
- **Microorganisme saprooganotrofe** (saprofite) se dezvoltă folosind ca sursă de carbon și energie, materia organică nevie. În această categorie intră majoritatea microorganismelor cu aplicații industriale, dar și bacteriile de putrefacție, mucegaiuri care se dezvoltă pe alimente ș.a.
- **Microorganisme comensale** se dezvoltă la suprafața sau interiorul organismelor vii (plante sau animale) beneficiind de această asociere și hrănindu-se cu substanțe ce rezultă în mod natural din activitatea metabolică a acestora. Se pot exemplifica microorganismele din microbiota epifită a plantelor, a pielii, din microbiota intestinală.
- **Microorganisme patogene** sau parazite pot fi *strict patogene* fiind specializate să se hrănească și să trăiască parazitând celula vie. Acestea pot fi vehiculate prin alimente contaminate, încât prin ingerare, microorganismele pătrund în circuitul sangvin, se localizează pe organe specifice și atunci când agentul patogen va învinge forțele de apărare ale organismului, se declanșează starea specifică de boală.
- **Microorganismele *potențial patogene*** pot să crească pe produse alimentare bogate în nutrienți și pot în anumite condiții să elaboreze toxine, încât prin ingerarea alimentului contaminat se produc stări de toxiinfecții alimentare sau toxicoze.

5.2. SURSELE DE CARBON PREFERATE DE MICROORGANISMELE ORGANOTROFE

O caracteristică nutrițională a microorganismelor este extraordinara lor flexibilitate în raport cu sursa de carbon, dovadă că nu există nici o sursă naturală de C care să nu fie utilizată pe cale microbiană. În timp ce *Pseudomonas cepacia*

poate utiliza peste 100 surse diferite de C, alte bacterii de exemplu din gen *Leptospira* folosesc ca sursă principală de C și energie numai acizii grași c număr mare de C în moleculă (Prescott M.L et. al,1990)

Dintre sursele de carbon naturale întâlnite în materii prime alimenta sau utilizate în compoziția mediilor de cultură, sunt preferate următoarele:

- poliglucide: amidon, celuloza, substanțe pectice, care pot fi folosite î special de către bacterii și mucegaiuri producătoare de enzime specific extracelulare. Drojdiile fermentive ale g. *Saccharomyces* nu produc amilaz motiv pentru care înainte de fermentare, plămezile amidonoase sunt zaharifica chimic/enzimatic.
- monoglucidele (hexoze, pentoze), diglucide, reprezinta atât sursă d carbon cât și de energie pentru toate microorganismele și sursa de bază î nutriția drojdiilor.
- acizi organici (acid lactic, malic, acetic) pot fi o sursă de carbon pentru mucegaiuri și unele drojdii.
- alcoolii sunt utilizați de către drojdii oxidative (g. *Candida*, g. *Pichia*) și de bacterii (g. *Acetobacter*).

Deoarece carbonul reprezintă max. 50% din substanța uscată a celule la alcătuirea mediilor de cultură se calculează cantitatea de nutrient ce trebuie adăugat (în funcție de masa moleculară și de conținut în carbon),pentru obținerea unei cantități corespunzătoare în biomasă.

5.3. NUTRIENȚI CU N, P, S

Pentru creștere, microorganismele necesită cantități mari de azot, fosfor și sulf, iar organotrofii le pot procura fie din sursele organice cu carbon fie din compușii anorganici.

Se știe că azotul (10-14% din substanța uscată a celulei) este necesar pentru sinteza de aminoacizi, purine, pirimidine, unele lipide, coenzime ș.a.

Multe microorganisme pot folosi azotul din aminoacizi și amoniac prin încorporarea directă, cu ajutorul unor enzime (glutamat dehidrogeneza, glutamin sintetaza). Unele bacterii pot reduce și asimila azotul atmosferic folosind un sistem de nitrogenaze și au un rol vital în asigurarea circuitului natural al azotului.

Pentru organotrofi, nutriția azotată este asigurată de compușii organici macromoleculari cu azot,produșii de hidroliză ai acestora, precum și de alte săruri cu azot (săruri amoniacale, azotați ș.a)

Protidele pot fi folosite în nutriție numai de către microorganisme ce produc proteaze extracelulare, respectiv, bacterii - agenți ai putrefacției și mucegaiuri - agenți ai putrezirii. Drojdiile care produc numai proteaze intracelulare, folosesc în nutriția azotată produșii de hidroliză ai protidelor și

anume peptone, peptide şi aminoacizi. Se mai pot folosi în mediile de cultură a drojdiilor, sulfatul de amoniu şi ureea. Alţi compuşi cum ar fi nitraţii sunt asimilaţi de către mucegaiuri şi bacterii; nitriţii numai de către bacterii (g. Nitrosomonas) şi au efect toxic pentru fungi (Înmulţirea drojdiilor este oprită la concentraţii de 200 mg nitriţi·dm^{-3})

Nutriţia minerală.

Pentru procurarea elementelor minore, sunt preferate de către microorganisme, săruri ale acestora, în următoarea succesiune: fosfaţi>sulfaţi>azotaţi>carbonaţi. Studii privind necesarul în substanţe minerale efectuate de Raulin au arătat importanţa pe care o au diferitele elemente în procesul de creştere microbiana. El stabileşte o lege demostrând că creşterea microorganismelor este dependentă de elementul necesar care se află în concentraţia cea mai mică. Efectul pe care îl are adăugarea diferitelor substanţe minerale asupra creşterii poate fi definit prin *indicele de utilitate specifică*, ce reprezintă raportul dintre biomasa formată pe un mediu de cultură complet şi cea rezultată în mediul carenţat în substanţa/elementul respectiv.

5.4. FACTORII DE CREŞTERE

Multe microorganisme pot să crească folosind sursele nutritive din care îşi procură macro şi micro elementele necesare pentru sinteza integrală a tuturor compuşilor celulari. Alte microorganisme, prin pierderea unor enzime nu sunt capabile de a sintetiza toţi constituienţii indispensabili creşterii, motiv pentru care necesită prezenţa acestora (sau a unor precursori) în mediul ambiant.

Sunt denumite, factori de creştere, substanţe organice ce sunt esenţiale pentru creşterea microbiana dar nu pot fi sintetizate de microorganismul respectiv. Conform exigenţelor nutritive ale microorganismelor, încadrate în primul tip de nutriţie, se poate stabili o anumită succesiune; cele mai pretenţioase din punct de vedere nutritiv sunt bacteriile Gram-pozitive, urmate de bacterii Gram-negative, şi respectiv drojdii şi mucegaiuri.

Factorii de creştere ca structură şi funcţie metabolică, intră în următoarele trei categorii:

- **aminoacizii** sunt necesari pentru sinteza de proteine
- **purine** şi **purimidine**, pentru sinteza acizilor nucleici
- **vitamine** care funcţionează ca grupări prostetice ale unor enzime, ale unor proteine purtător sau cu funcţie de coenzime.

Aminoacizii sunt necesari în concentraţii de 10^{-4}M, utilizarea lor în metabolism nu are caracter de specificitate deoarece sunt folosiţi pentru formarea diferiţilor constituienţi proteici.

În funcţie de natura microorganismelor necesarul de aminoacizi variază între 0 şi 18 aminoacizi. (De exemplu *Leuconostoc mesenteroides* are nevoie de 17 aminoacizi şi poate utiliza şi peptidele ce îi conţin)

Purinele şi pirimidele sunt necesare în concentraţie de $10^{-4}\div10^{-5}$M, iar vitaminele în concentraţii mici de 10^{-6}M, echivalent cu cantităţi de ordinul ng (nanograme) sau ppm/greutate substanţă uscată.

Dintre microorganismele de importanţă în industria alimentară, drojdiile genului *Saccharomyces* necesită biotină şi acid paraaminobenzoic, bacteriile lactice ale genului *Lactobacillus* necesită acid folic, acid nicotinic, biotină, vitamina B_{12}, piridoxina, bacteriile acetice necesită acid p-aminobenzoic iar *Enterococcus faecalis* are nevoie de 8 vitamine diferite pentru creştere.

Unii mutanţi care îşi pierd prin mutaţie capacitatea de a sintetiza un nutrient esenţial şi de aceea trebuie să-l obţină din mediu, este denumit **auxotrof**.

Necesarul în factori de creştere este atât de specifică încât atunci când un auxotrof este cultivat într-un mediu în care creşterea este limitată de un factor esenţial, multiplicarea şi cantitatea de biomasă este direct proporţională cu concentraţia acestui factor în mediu. Acest proces este utilizat în practică pentru dozarea aminoacizilor, a tiaminei,utilizând ca microorganism test *Streptococcus salivarius* sau *Saccharomyces cerevisiae*, a riboflavinei şi acidului pantotenic cu *Lactobacillus casei* şi a altor vitamine a căror determinare pe cale chimică este mai dificilă (Zarnea G,1984)

Există şi un grup restrâns de substanţe denumite factori stimulatori de creştere care fără să fie indispensabile, prezenţa lor accelerează ritmul de creştere celulară. Alte microorganisme sunt independente de prezenţa în mediu a acestor factori, deoarece au capacitatea de a-şi autosintetiza factorii de creştere necesari. Din acest grup fac parte mucegaiurile şi multe bacterii care se dezvoltă în cele mai vitrege condiţii de viaţă.

Cunoaşterea condiţiilor de cultură şi a exigenţelor de nutriţie a fiecărui microorganism are o importanţă deosebită atât în practica de laborator cât şi la cultivarea industrială, deoarece permite reglarea activităţii fiziologice fie în direcţia obţinerii de biomasă, fie a unor produşi de metabolism cu importanţa economică.

5.5. MODALITĂŢI DE TRANSPORT A NUTRIENŢILOR ÎN CELULA MICROBIANĂ

Pentru realizarea procesului de nutriţie, este obligatoriu ca nutrienţii să pătrundă în interiorul celulei pentru a fi metabolizaţi. Căile de transfer a moleculelor-nutrient sunt specifice. Astfel microorganismele nu acceptă substanţe pe care nu le poate asimila, au capacitatea de a transporta în celulă nutrienţii de care au nevoie chiar dacă aceştia se află în concentraţii reduse, (contra unui anumit gradient de concentraţie), iar moleculele nutrient trebuie să pătrundă prin membrana plasmatică cu permeabilitatea selectivă, care nu lasă să treacă liber orice substanţă.

Compușii organici macromoleculari (proteine, poliglucide, lipide) în prima etapă sunt solubilizați prin acțiunea exogenă a enzimelor specifice de hidroliză, atunci când microorganismul are capacitatea de a sintetiza asfel de enzime. Deoarece hidroliza acestora are loc în exteriorul celulei, energia potențială eliberată prin scindare se pierde sub formă de căldură și nu este folosită de celulă.

Nutrienții solubili, cu molecule mici pot pătrunde în celula microbiană pe diferite căi. Una din căile cele mai frecvente este pătrunderea prin difuzie și anume prin:

- **Difuzie pasivă** este difuzia ce se realizează ca urmare a unui gradient de concentrație, posibil când în exteriorul celulei concentrația nutrientului este superioară celei din interiorul celulei. Prin anumiți pori ai membranei plasmatice, nutrientul pătrunde în interior și este metabolizat.

Transferul pasiv este posibil pentru molecule cu dimensiuni de maximum 0,4-0,6 nm (molecule de apă, gaze, ioni, glicerol) molecule cu caracter hidrofob. Rata de difuzie este dependentă de mărimea gradientului de concentrație (concentrația nutrientului în exterior trebuie să fie mare) și este un proces lent, ineficient, nespecific. Prin difuzie simplă pot pătrunde în celule și substanțe toxice sau cu efect inhibitor. Cu cât molecula are un mai pronunțat caracter hidrofob deci, este mai liposolubilă,poate să străbată dublul strat lipidic membranar prin difuzie simplă.

Difuzia facilitată se realizează ca urmare a prezenței în biomembrane a unor proteine receptoare denumite **permeaze**, localizate la nivelul plasmalemei sau în spațiul periplasmic; această difuzie este stereospecifică, se realizează față de un gradient de concentrație iar celula nu consumă energie pentru acest transfer.

Se consideră că permeaza leagă reversibil la un situs activ un singur tip de moleculă. În urma legării ce are loc pe o față a membranei se formează un complex moleculă-permează ce traversează dublul strat lipidic, disociindu-se de cealaltă față a membranei, cu eliberarea moleculei transportate.

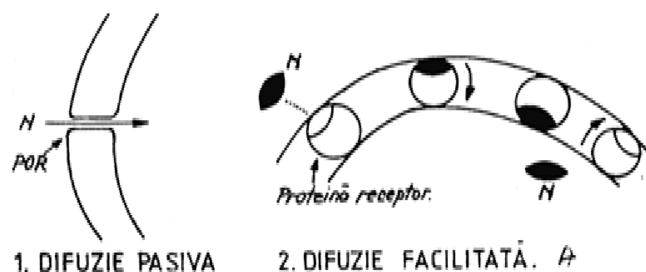


Fig. 29 - Modele de difuzie

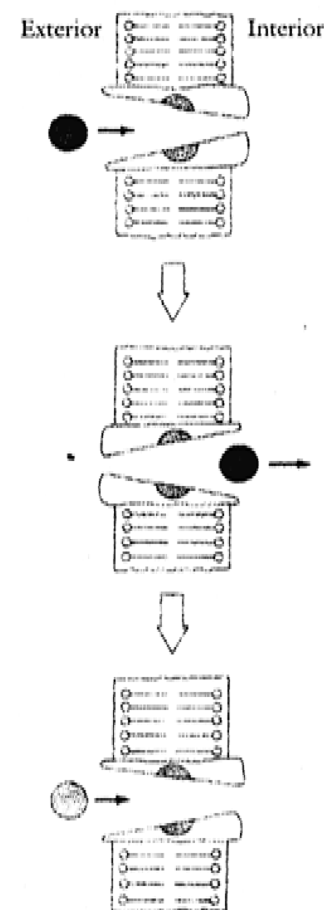


Fig. 29 - Model de difuzie facilitată (B)

Proteina purtător (permeaza) recunoaște și leagă molecula solubilă apoi schimbându-și conformația o eliberează în interiorul celulei. Apoi aceasta își reia poziția orientată spre exteriorul membranei plasmatice și este pregătită pentru a prelua o nouă moleculă. Acest proces poate avea loc atâta timp cât concentrația moleculelor nutrient este mai mare în exteriorul celulei față de cea internă (Fig. 29 B).

Difuzia facilitată este mai importantă la celulele de tip eucariot pentru transportul aminoacizilor și al glucidelor, în timp ce la procariote servește pentru transportul glicerolului.În fig. 30 este schematizat mecanismul de transport al glucozei.

Se consideră că glucoza este legată de situsul specific localizat pe fața exoplasmatică D-gluco-permeazei și are loc modificarea de conformație a proteinei transportor. Modificarea poate consta în deplasarea spre interiorul proteinei a lanțurilor de aminoacizi hidrofili ce delimitează un canal prin care poate trece glucoza. Odată intrată în celulă permeaza revine la conformația inițială. Prin pătrunderea glucozei, nu se modifică gradientul de concentrație deoarece glucoza este rapid fosforilată sub acțiunea hexochinozei și în prezență de ATP, formă în care nu mai părăsește celula.

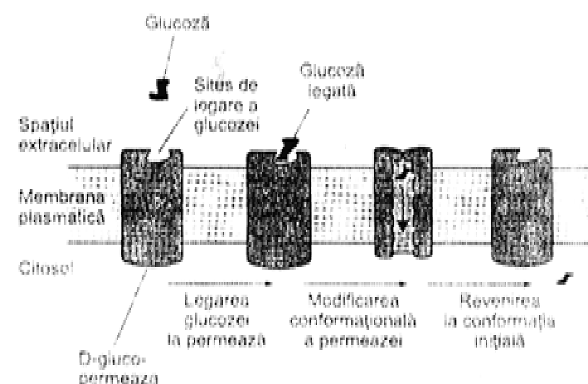
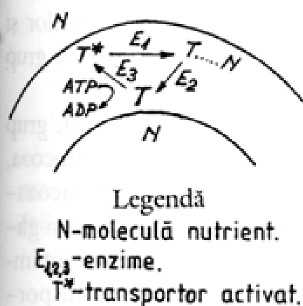


Fig. 30. Difuzarea facilitată a glucozei

Prin același sistem pot fi importați aminoacizi legați de ARN-t sau sunt eliminați unii cataboliți din celulă.(Voiculeț N.,1997)

Microorganismele adesea se întâlnesc în habitate în care conținutul în nutrienți este foarte redus încât pentru creștere este important transportul și concentrarea lor în celulă. În această situație transportul se face contra gradientului normal de concentrație, cu consum de energie, prin transport activ și translocație de grup.

- **Transportul activ** are următoarele particularități: transportul în celulă este asigurat chiar în absența gradientului de concentrație și se realizează cu consum de energie. Acest transport a fost demonstrat în cazul drojdiilor care pot acumula intracelular o cantitate mai mare de glucide și aminoacizi decât cea existentă în mediul de cultură. Se admite că o moleculă-transportor care consumă o cantitate de energie pentru a se activa și a produce o legătură instabilă cu molecula nutrientului, printr-o reacție catalizată enzimatic, transferă nutrientul și îl eliberează în interior. Transportul se activează ca urmare a energiei eliberate prin transformarea ATP în ADP. (fig. 31)



Legendă
N-moleculă nutrient.
$E_{1,2,3}$-enzime.
T*-transportor activat.

Fig. 31. Model pentru transport activ

- **Translocația de grup** este un transport activ întâlnit la drojdii și mucegaiuri în care intervine un sistem enzimatic complex de transferaze, care permit pătrunderea glucidelor prin membrane sub forma esterilor fosforici. Astfel fosfoenol-piruvatul se poate combina cu molecula de glucid din exteriorul celulei și se transformă în piruvat și esterul fosforic al glucidului, care sub această formă este transportat în interior.

Celulele pot face schimb cu mediul exterior nu numai cu ioni și glucide ci și cu compuși macromoleculari. Astfel bacteriile de exemplu pot secreta proteine (enzime exogene, proteine din structura capsulelor) printr-un proces de exocitoză.

Este posibilă și pătrunderea unor astfel de macromolecule în interiorul celulei prin procese de endocitoză.

Endocitoza poate fi întâlnită la drojdii când regiuni mici ale plasmei suferă plieri în interior cu formare de vezicule cu diametrul de aproximativ 0,1nm.

Endocitoza poate fi mediată de anumiți receptori plasați pe suprafața membranei care recunosc macromolecula iar regiunea plasmalemei ce conține complexul receptor ligand suferă invaginări și are loc internalizarea compusului nutritiv macromolecular.

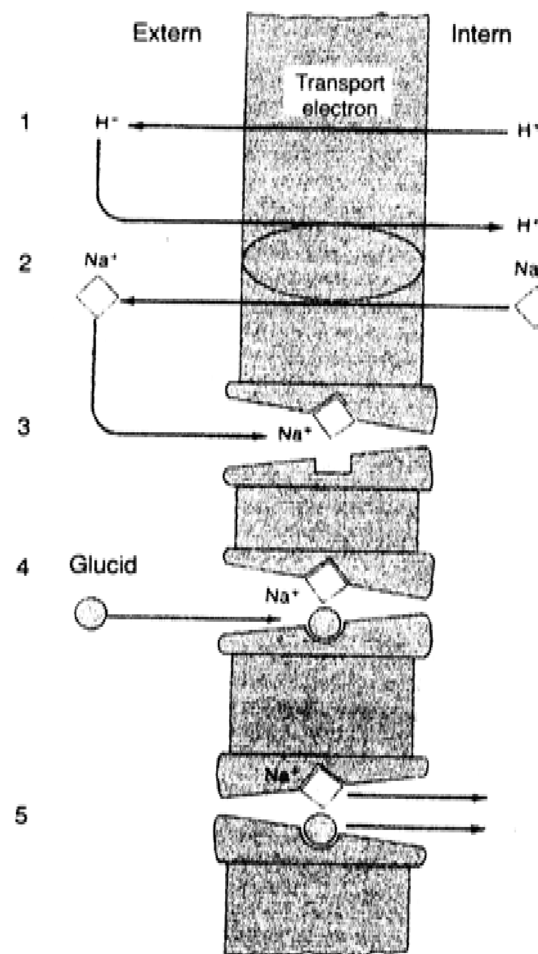


Fig. 32. Transport prin gradient protonic

În cazul microorganismelor acvatice-protozoare există sistemul de **pinocitoză** prin care nutrientul din exterior este înglobat în interior (se formează o picătură suspendată și are loc eliberarea în interiorul celulei a moleculei nutrient). Bacteriile folosesc preponderent 2 sisteme diferite de transport a nutrienților și anume atât translocația de grup cât și simportul.

Prin translocație de grup pot fi transportate: glucoza, manitolul, N-acetilglucozamina, fructoza, maltoza și glicerolul, proces în care sunt implicate 4 proteine transportoare.

Numeroase microorganisme, mai ales bacteriile, mai pot folosi în afara energiei din legături macroergice pentru transport intracelular, așa numitul gradient protonic rezultat în urma transportului de protoni si ioni care acționează permanent în celula vie. Se admite că acest gradient protonic acționează ca o pompă electrochimică deoarece Na^+ de exemplu, ajungând în exterior poate lega o moleculă de **nutrient**, poate modifica conformația proteinei membranare, să adere la molecula nutrientului și împreună să ajungă în interiorul celulei. Daca intracelular ionul de sodiu se află în concentrație redusă, el se eliberează de pe molecula nutrient și este transferat în exterior (Fig. 32).

Prin translocație sau transport de electroni sau protoni bacteriile pot acumula intracelular concentrații de substanțe 10-100 ori mai mari decât în mediul extern.

Transportul fierului în celulă

Fierul trivalent este insolubil și transportul în celulă (la bacterii și fungi) poate fi realizat prin intermediul unor substanțe cu masă moleculară redusă denumite **siderofori** care formează complex cu ionul feric. Când complexul fier-siderofor a atins suprafața celulei el este legat de o proteină siderofor receptoare și întregul complex este transportat în interior unde Fe^{3+} este redus la forma de ion feros (Fe^{2+}) care intră în componența citocromilor și a enzimelor.

5.6. MEDII DE CULTURĂ

Un mediu de cultură reprezintă un substrat nutritiv complex, cu rol de aliment, care trebuie să asigure microorganismului ce urmează a fi cultivat, cantitatea necesara de apă, surse de carbon, azot, săruri minerale, factori de creștere, substanțe care să îi furnizeze cantitatea de energie cât și toate elementele folosite de celulă în procese de creștere, reproducere și întreținerea funcțiilor vitale.

Mediul de cultură trebuie să îndeplinească următoarele condiții:

- să corespundă din punct de vedere nutritiv,
- să aibă o concentrație a substanțelor dizolvate în mediu care să nu influențeze negativ schimburile osmotice ale celulei,
- să nu conțină substanțe toxice sau să genereze compuși toxici în urma creșterii culturii microbiene,
- să aibă un anumit pH sau rH
- să fie steril (lipsit de microorganisme vii) astfel încât să se dezvolte numai celulele introduse prin inocul.

Mediile de cultură se folosesc în practica de laborator sau în practica industrială și sunt foarte diferențiate în funcție de scopul urmărit. În tehnica de laborator mediile se folosesc pentru izolarea din medii naturale a diferitelor microorganisme, pentru obținerea de culturi pure, pentru cultivarea acestora în scopul obținerii de biomasă sau pentru întreținerea culturilor pure selecționate. În scopuri industriale se folosesc pentru obținerea de celule sau a compușilor rezultați prin activitatea microorganismelor selecționate.

În funcție de destinația lor, mediile de cultură se diferențiază astfel:

Medii de cultură generale, care asigură dezvoltarea unui număr mare de specii și genuri deoarece includ în compoziția lor substanțe aliment diversificate. Dintre mediile de cultură generale folosite în practica laboratorului de microbiologie menționăm bulionul de carne lichid sau gelozat (BCA); mediul triptonă - extract de drojdie - glucoză - agar (TEGA) pentru cultivarea bacteriilor și mustul de malț - agar (MMA) pentru cultivarea drojdiilor și mucegaiurilor. Mediile de cultură pot fi *definite* atunci când în compoziția lor

intră substanțe chimice pure ce pot fi exact dozate conform rețetei sau medii *complexe* în care intră compuși naturali cu o compoziție variabilă.

Medii de cultură selective sunt medii cu o compoziție chimică definită care permit dezvoltarea unui grup restrâns de microorganisme sau chiar a unei specii. Aceste medii conțin pe lângă substanțe nutritive și substanțe cu efect inhibitor asupra altor microorganisme însoțitoare întâlnite în microbiota din care se face izolarea culturii ce dorim să o selecționăm. Un mediu selectiv folosit la determinarea bacteriilor coliforme este BLBV (bulion-bilă-lactoză-verde briliant) în care sărurile biliare inhibă alte bacterii, în timp ce coliformii sunt adaptați. Numărul mediilor selective este foarte mare și permit izolarea unor specii de interes industrial sau se folosesc pentru identificarea, determinarea, prezența microorganismelor contaminante, în produse alimentare.

Medii de cultură de diferențiere - aceste medii permit separarea speciilor în funcție de anumite caractere biochimice atunci când acestea au fost selectate dintr-o microbiotă heterogenă. De exemplu dacă pe un mediu selectiv s-au izolat bacterii ale grupului coliform, prin folosirea mediilor de diferențiere pot fi definite speciile componente ale grupului.

Medii de îmbogățire (fortifiate) sunt destinate separării și cultivării unor microorganisme pretențioase din punct de vedere nutritiv și care se află în număr redus în produsul analizat din punct de vedere microbiologic. Pentru a le pune în evidență se fac treceri din produsul alimentar în mediul de îmbogățire, steril și se asigură înmulțirea celulelor izolate. Din mediu în care s-a produs înmulțirea acestora se face transfer de celule pe medii de diferențiere iar rezultatul se exprimă prin prezența/absența lor. De exemplu la determinarea bacteriilor din genul *Salmonella* - agenți ai toxiinfecțiilor alimentare, normele microbiologice stabilesc absența lor în 25 g produs.

Clasificarea mediilor de cultură se poate face în funcție de compoziție și proveniență, în medii naturale și medii sintetice.

Mediile naturale sunt cele mai utilizate deoarece reproduc condițiile în care se dezvoltă microorganismele. Mediile naturale de origine vegetală sunt sucuri de fructe, de legume, mustul de malț, legume fierte/terciuite (morcovi, cartofi) fructe, infuzii de plante ș.a. Ca medii de origine animală se folosesc după sterilizare, laptele, sânge (pentru bacterii facultativ patogene), zerul, carne, bulionul de carne, ficat, ouă.

În condiții de laborator se folosesc atât **medii lichide**, în special pentru cultivarea microorganismelor facultativ anaerobe, pentru studiul proceselor fermentative, **medii solide** - pâine, cartofi felii, ș.a și frecvent **medii solidificate** obținute prin adăugarea în mediile lichide a unor agenți de solidificare.

Pentru **solidificarea** mediilor de cultură se folosește: **agar-agarul** (geloza) un poliglucid obținut din alge ale genului *Gelidium* având în structură

molecule de galactoză și acid D-galacturonic legate prin legături 1,2; 1,3 glicozidice. În stare purificată se prezintă sub formă de pulbere sau fibre și se adaugă în cantitate de 0,5-2% mediu lichid. Are o mare capacitate de îmbibare și în prezența apei își mărește volumul de cca 16 ori. Se solubilizează la temperatura de fierbere și gelifică la temperatura de 42-45°C. Agarul are calitatea de a fi bun agent de solidificare deoarece nu este hidrolizat pe cale enzimatică. În mediu acid la temperaturi de sterilizare își pierde capacitatea de a forma gel.

Un alt agent de solidificare este **gelatina**, de natură proteică, extrasă din țesuturi colagenice. Se folosește în cantitate de 12-15 g %. Se fluidifică la temperaturi mai mari de 35°C și gelifică lent sub temperatura de 30-25°C. Are dezavantajul că poate fi folosită ca nutrient de către microorganisme cu activitate proteolitică și în acest caz își pierde proprietățile de gel de aceea este folosită pentru izolarea microorganismelor care produc proteaze endogene (drojdii).

În afara mediilor descrise și care se pot prepara în condiții de laborator, numeroase firme: (Difco, Sartorius, I. Cantacuzino ș.a) sunt specializate în fabricarea de medii de cultură ce pot fi livrate sub diverse forme. Astfel sunt medii gata preparate sau sub formă de pulberi ce pot fi reconstituite conform rețetei și au un termen îndelungat de valabilitate.

Medii fermentative sunt medii de cultură industriale destinate producerii unor cantități mari de celule sau pentru obținerea de produși de metabolism cu valoare economică. În compoziția acestor medii intră ca surse de carbon; melasa, produs secundar rezultat la fabricarea zahărului și care conține cca 45-55% zaharoză și săruri minerale, diferite tipuri de făinuri, cereale boabe, zerul bogat în lactoza, tărâțe cu aprox. 20% amidon ș.a.

Dintre surse de azot amintim: făinuri proteice de soia, sulfatul de amoniu, ureea, îngrășământul complex. Pentru îmbogățirea în săruri minerale se adaugă: fosfați/sulfați, cloruri. La cultivarea microorganismelor dependente de prezența factorilor de creștere, se adaugă extract de porumb, obținut prin concentrarea apelor rezultate la înmuierea porumbului, bogat în aminoacizi, vitamine, acid lactic, microelemente, de asemenea extractul de drojdie, extract din radicele de malț și gemeni de grâu/porumb.

Diversitatea mediilor de cultură este datorată și capacității de adaptare a numeroaselor microorganisme întâlnite în habitaturile naturale cât și de faptul că prin modificarea compoziției mediilor de cultură se pot obține randamente superioare în produși de metabolism microbian cu valoare economică.

Mediile de cultură sunt utilizate frecvent în tehnici microbiologice de laborator, pentru izolarea, cultivarea și întreținerea culturilor pure și pentru controlul microbiologic al produselor alimentare.

CAPITOLUL 6
METODE DE IZOLARE ȘI OBȚINERE A CULTURILOR PURE

Cultura pură reprezintă o biomasă de celule prin reproducere dintr-o singură celulă aflată într-un mediu nutritiv steril, cu volum limitat. Cultură pură este considerată și colonia care se formează ca rezultat al izolării unei celule, sau a unei unități formatoare de colonie, atunci când aceasta este localizata pe un mediu nutritiv solid. Puritatea unei culturi se poate obține și prin repicare, deci prin transfer de celule din eprubeta ce conține cultura pură, în alt vas cu mediu de cultură steril.

În practica de laborator se cunosc numeroase metode prin care se poate realiza separarea unei singure celule din microbiota heterogenă a mediilor naturale. Metodele cunoscute și practicate în laborator în scopul izolării culturilor pure, pot fi clasificate în metode fizice-mecanice și metode biologice.

6.1. METODE FIZICE DE IZOLARE ȘI OBȚINERE A CULTURILOR PURE

Metode prin răspândire

Se folosesc pe scară largă, fiind ușor de executat, având ca principiu răspândirea celulelor din medii naturale unde acestea se află în număr mare, prin diluare în medii lichide sau prin diseminare mecanică pe suprafața mediilor sterile.

Metode scarificate. În placa Petri se repartizează un mediu de cultură adecvat, de exemplu MMA/BCA și după solidificarea mediului, cu firul metalic se recoltează celule din mediul natural și se execută trasări pe suprafața mediului, astfel încât diversele celule rămân distanțate între ele. Prin termostatare 48-72 ore, din colonia care corespunde microorganismului ce trebuie sa fie izolat, se face repicare în eprubete cu mediu solid înclinat (eprubete cu slant-agar) și astfel se obține o cultură pură.

Metoda în strii este similară, în schimb, drept suprafață de răspândire se folosește mediul înclinat din 2-3 eprubete, prin transferul de celule din mediul natural, prin realizarea de striuri, în mod succesiv. Aceste metode se folosesc și în cazul în care o cultură pură este contaminată cu microorganisme străine în perioada de păstrare a culturii și aceasta trebuie să fie salvată.

Metoda culturală Koch este folosită în special pentru izolarea de drojdii. Ca mediu de răspândire se foloseşte mustul de malţ cu gelatină repartizat în 3 eprubete, fluidificat şi menţinut la 40°C. Din mediul natural, de exemplu un must în fermentaţie, se recoltează o ansă care se introduce succesiv în cele 3 eprubete, cu agitare, care să asigure desprinderea celulelor. După inoculare şi uniformizare, conţinutul fiecarei eprubete se repartizează în câte o placă Petri; prin solidificare, celulele rămân fixate în gel şi prin multiplicare vor forma colonii/clone izolate. În funcţie de densitatea celulelor recoltate iniţial, în placa a 2-a sau a 3-a coloniile sunt suficient de distanţate, (se preferă distanţe de cca 2 cm), pentru a putea face izolarea din colonia adecvată a culturii pure, prin repicare în eprubetă cu slant agar.

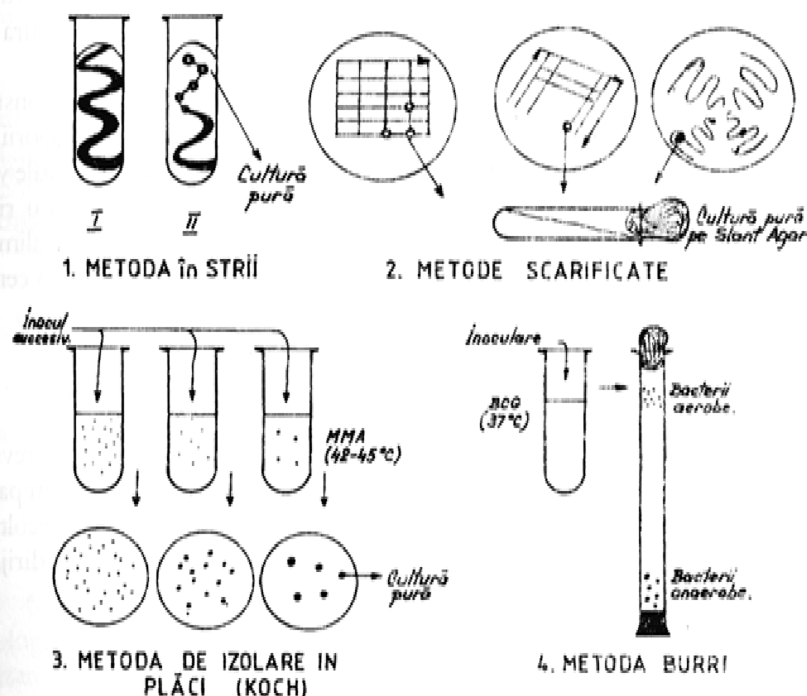


Fig. 33. Metode de izolare şi obţinere a culturilor pure

Metode prin diluare

În prima etapă, din mediul natural se execută diluţii decimale în ser fiziologic steril, astfel încât numărul de celule într-o micropicatură din ultima diluţie să fie redus.

Metoda Lindner se foloseşte pentru izolarea de drojdii fermentative. Din diluţia convenabilă, cu ajutorul unei peniţe topografice se plasează 9 picături pe suprafaţa unei lamele sterile. Lamela se amplasează cu picăturile în jos pe o lamă cu escavaţie şi se studiază la microscop fiecare picătură. Se notează cu un marker conturul picăturii în care se află o singură celulă. Se desprinde lama şi cu ajutorul unei benzi sterile de hârtie se absoarbe picatura notată. Odată cu lichidul se adsoarbe şi celula de izolat, apoi banda se introduce într-o eprubetă cu must lichid. Celula va da prin reproducere o cultură pură. Deşi este meticuloasă, metoda propusă de Lindner este o metodă precisă deoarece se face sub control microscopic.

Metoda Naumov este folosită pentru izolarea culturilor pure de mucegaiuri. Dintr-o diluţie convenabilă se aplică distanţat, micropicături de mediu MMA fluidificat (42°C) şi după 2-3 zile se selectează din picătura cu o singură colonie, cultură pură dorită.

O metodă simplificată pentru separarea sporilor fungici consta în inundarea unei plăci cu MMA cu 1-2 cm^{-3} din diluţia convenabilă. Sporii care au rămas ataşaţi de mediu vor da colonii izolate şi acestea dacă sunt utile vor fi transferate în eprubete cu slant-agar. În general mucegaiurile nu ridică probleme la izolare deoarece cresc sub formă de colonii mari pe diverse alimente şi pentru obţinerea în cultură pură se face repicarea de spori situaţi în centrul coloniei

Metoda de izolare cu ajutorul micromanipulatorului.

Este o metodă precisă şi se realizează cu ajutorul unui aparat prevăzut cu tuburi capilare cu care se poate face selecţia celulelor dorite din preparate studiate la microscop. Cu ajutorul micromanipulatorului se poate face recoltarea de ascospori din celule ascogene şi este folosit în realizarea genetică în dirijarea proceselor de fuziune a protoplaştilor, pentru conjugare ş.a.

6.2. METODE BIOLOGICE DE OBŢINERE A CULTURILOR PURE

Metodele biologice sunt foarte diverse şi se bazează pe proprietăţi fiziologice ale microorganismelor de izolat care să se diferenţieze clar de cele ale microorganismelor însoţitoare din acelaşi biotop. Uneori prin aceste metode se face izolarea unui grup cu caractere taxonomice apropiate şi apoi se face izolarea de culturi pure prin tehnici de răspândire sau prin folosirea mediilor selective.

O metodă biologică clasica este **metoda Burri** prin care se face separarea microorganismelor în funcție de necesarul de oxigen pentru creștere. Dintr-un dintr-un mediu natural se face inocularea în BCA fluid (42°C) și după uniformizare acesta se introduce într-un tub de sticlă, prevăzut la un capăt cu dop de cauciuc. Prin răcire celulele sunt imobilizate în gel și prin termostatare, în funcție de accesul oxigenului din aer, în zona tubului prevăzut cu dop de cauciuc se vor dezvolta bacterii anaerobe, intermediar bacterii microaerofile iar în stratul de mediu la care aerul a pătruns prin dopul de vată al tubului, bacterii aerobe (Fig. 33-4).

Prin metode biologice pot fi selectate bacteriile sporogene din medii naturale, pe baza termorezistenței deosebite a endosporilor Astfel *Bacillus subtilis* se poate izola din infuzie de fân pe care formează un voal cutat, deoarece endosporii rezistă la fierbere în timp ce alte bacterii sunt distruse.

Numeroase metode de izolare se bazează pe introducerea în medii de cultură a unor substanțe chimice cu efect inhibitor asupra microorganismelor de care trebuie separată cultura dorită. De exemplu prin introducerea de 0,02% actidionă are loc inhibarea dezvoltării drojdiilor aflate în amestec cu bacterii. Metoda este folosită pentru izolarea unor bacterii ce pot produce contaminarea drojdiilor folosite sub formă de culturi pure în industrii fermentative.

6.3. IMPORTANȚA PRACTICĂ A CULTURILOR PURE

Izolarea și obținerea culturilor pure, cunoașterea cineticii de creștere, prezintă o importanță practică deosebită, în urmatoarele domenii:

Identificarea, selecționarea și îmbunătățirea proprietăților de biosinteză

Culturile pure sunt folosite pentru studiul proprietăților morfologice și fiziologice, în scopul identificării, caracterizării și stabilirii domeniului de utilizare a culturii.

Microorganisme aparținând aceleași specii, în funcție de sursa de izolare pot fi folosite pentru selecționarea și îmbunătățirea proprietăților lor de metabolism. Sub formă de culturi pure microorganismele pot fi supuse unor tratamente fizico-chimice prin care se pot induce modificări genetice la nivelul acizilor nucleici, cu obținerea de culturi mutante din rândul cărora se face din nou selecția tulpinilor performante.

Obținerea culturilor starter în procese fermentative industriale

Pornind de la cultura pură, în biotehnologii alimentare prin cultivarea în medii adecvate se obține cantitatea necesară de inocul/maia folosită drept cultură starter a procesului fermentativ. *Inoculul reprezintă un mediu nutritiv steril în care s-au înmulțit celule aparținând unei culturi pure, aflată în etapa finală a creșterii exponențiale.* Cantitatea de inocul trebuie astfel calculată încât prin introducerea sa în mediul fermentativ steril, concentrația în celule să asigure declanșarea rapidă a procesului fermentativ. Pornind de la eprubeta cu cultură pură se face la început activizarea celulelor prin transfer succesiv în mediu de cultură steril, cu o compoziție similară cu a mediului care trebuie să fie fermentat pentru a elimina etapa de adaptare, astfel încât după 3-4 pasaje să se obțină cantitatea de inocul necesar sau cultura de producție. Obținerea cantității de inocul și a densității de celule pentru declanșarea rapidă a fermentației în condiții industriale se realizează prin transfer de volume egale cu 1-2% pentru bacterii, 4-5% pentru drojdii și 5-10% pentru mucegaiuri, pasaje intercalate cu perioade de termostatare în condiții optime pentru înmulțirea exponențială a celulelor.

În funcție de specificul biotehnologic este obligatorie asigurarea continuității în transfer pentru aprovizionarea cu inocul activ, la perioada solicitată de producție.

Utilizarea culturilor pure în biotehnologii alimentare (la fabricarea berii, spirtului, vinului, produse lactate acide, panificație ș.a) permite obținerea unor produse cu calitate constantă.

Curba de creștere a culturii microbiene

Prin inocularea de celule, aparținând unei culturi pure, într-un mediu nutritiv steril se poate stabili dinamica de creștere prin studiul vitezei de acumulare a biomasei sau prin creșterea numărului de celule raportat la unitatea de volum a mediului. În timp ce la mucegaiurile inferioare la care prin creștere are loc diviziunea nucleilor și nu a celulei coenocitice, creșterea se apreciază prin determinarea masică a biomasei formate; la alte microorganisme la care concomitent cu diviziunea nucleară are loc și diviziunea celulară (înmugurire la drojdii, sciziune la bacterii, formarea de pereți despărțitori la mucegaiuri superioare) creșterea se apreciază fie prin acumularea de biomasă fie prin determinarea numărului de celule.

Faze de creștere. Dacă în mediul nutritiv steril, limitat cantitativ (în sistem închis) se face inocularea cu No celule de același fel, prin creștere și înmulțire, în timp, se reduce conținutul de nutrienți și crește conținutul în produse rezultate prin catabolizarea acestora. Prin determinarea periodică a numărului de celule, considerând că reproducerea are loc prin diviziune, dacă

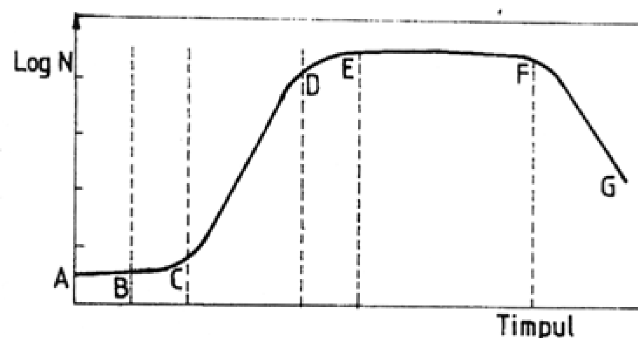


Fig. 34. Curba de creştere microbiană în sistem închis

se exprimă grafic pe ordonată logaritmul numărului de celule şi pe abscisă timpul de incu–bare, rezultă o curbă caracteristică alcătuită din faze distincte.

AB - este o **fază lag** în care nu se constată o creştere a numărului de celule. În această fază are loc o adaptare a celulelor la condiţiile de mediu, are loc biosinteza de ADN/ARN şi o activizare a sistemelor enzimatice şi elaborarea de enzime induse. În cazul drojdiilor această fază poate dura 1-2 ore, durată ce depinde de compoziţia mediului şi capacitatea de reglare a metabolismului propriu.

Faza lag poate fi datorată faptului că celulele pot fi în vârstă şi sunt lipsite de rezerve de ATP, cofactori esenţiali şi ribozomi încât aceştia trebuie să fie sintetizaţi înainte de a începe creşterea. Dacă mediul este diferit de cel în care au crescut celulele inoculate, acestea necesită enzime noi necesare pentru a asimila diferiţii nutrienţi. Faza lag se poate prelungi mult dacă inoculul este obţinut din culturi vechi sau care s-au păstrat în condiţii de refrigerare. În schimb dacă la inoculare s-a folosit o cultură viguroasă, aflată în faza activă de creştere, în mediul cu o compoziţie similară, faza lag este scurtă sau poate să fie absentă.

BC - faza de început a creşterii are loc o mărire în dimensiuni a celulelor prin creşterea mai rapidă a volumului în raport cu suprafaţa celulară, ceea ce favorizează declanşarea procesului de reproducere.

CD - faza logaritmică (exponenţială) reprezintă faza în care creşterea masei de celule poate fi determinată cantitativ prin dublarea numărului de celule pe unitatea de timp (pentru drojdii şi bacterii) sau ca dublare a a biomasei/t pentru microorganisme filamentoase: streptomicete şi fungi. Prin exprimarea acestor valori pe o scară semilogaritmice rezultă o dreaptă. Dacă unghiul pantei aceste drepte este mic rezultă că condiţiile de creştere nu sunt favorabile. Deşi celulele produc o modificare a mediului de cultură prin asimilare de compuşi nutritivi şi eliberare de compuşi de catabolism, în **faza "log"** rata de creştere rămâne constantă.

Rata de creştere este independentă de concentraţia în nutrienţi atât tin cât aceştia se află în exces. Rata de creştere în biomasă X (g.dm^{-3}) este corel cu rata specifică de creştere μ şi densitatea celulelor N.

Rata specifică de creştere μ, este dependentă de trei parametri şi anur concentraţia substratului limitativ (S), rata maximă de creştere μ_m şi o consta specifică dependentă de substrat, K_s, conform ecuaţiei stabilită de Jaqu Monod:

$$\mu = \mu_m S/(K_s + S)$$

Constanta K_s este concentraţia substratului la care se obţin 1/2 din ra specifică maximă de creştere ($\mu = 0,5\mu_m$) şi este echivalentă cu constanta Micha lis în cinetica enzimatică. Dacă există un exces al tuturor nutrienţilor, atun $\mu = \mu_m$ şi cultura se află deci în faza **log** la rata maximă de creştere. Dacă un din nutrienţii preferaţi, de exemplu glucoza s-a epuizat, în prezenţa altor surs de carbon se observă aşa numitul fenomen de **diauxie** când se poate, după nouă fază lag, să aibă loc metabolizarea noului substrat şi creşterea exponenţial a celulelor.

La sfârşitul fazei log. se acumulează o cantitate maximă de biomas substratul este rapid epuizat şi cultura trece în faza staţionară de creştere. Rat specifică de creştere maximă, μ_m are o importanţă considerabilă în proces industriale în care se urmăreşte obţinerea de celule şi este dependentă de natur microorganismului şi de condiţiile de cultivare. De exemplu pentru mucegaiur aceasta poate să varieze între 0,090 - 0,61 h^{-1}.

La cultivarea lui *Aspergillus niger* pe mediu cu glucoză la 30°C s-a obţinu $\mu_m = 0,2$ şi un timp de dublare al biomasei de 3,46 h.

În timpul fazei exponenţiale de creştere, microorganismele cresc şi se divid la rata maximă posibilă, condiţionată de potenţialul lor genetic, natura mediului şi condiţiile de creştere. Populaţia formată în timpul acestei faze are proprietăţi chimice şi fiziologice uniforme, de aceea aceste culturi sunt folosite în studii biochimice sau în calitate de inocul pentru obţinerea culturilor starter în biotehnologie.

DE - faza de încetinire a creşterii ca urmare a epuizării treptate a nutrienţilor, reducerea concentraţiei în oxigen şi acumularea de compuşi de catabolism ce pot avea efect inhibitor asupra celulelor.

EF - faza staţionară de creştere, când se stabileşte un echilibru între numărul de celule care se formează prin reproducere şi a celulelor care se autolizează. Cantitatea de biomasă poate rămâne constantă deşi se schimbă ompoziţia celulelor. Datorită lizei unor celule se eliberează noi substraturi re vor servi drept nutrienţi pentru celule viabile. Această fază poate fi elungită atunci când urmărim păstrarea culturii pure, prin modificarea unor ..ctori care scad viteza de metabolism celular.

Faza staţionară este de obicei atinsă la o concentraţie de celule bacteriene de aprox. 10^9 celule cm^{-3}. Dimensiunea populaţiei va depinde de dimensiunea celulelor, nutrienţii disponibili, natura microorganismului.

În faza staţionară celulele pot să rămână active din punct de vedere metabolic fără să aibă condiţii de înmulţire. Intrarea în faza staţionară în cazul culturilor aerobe, este determinată de limitarea conţinutului de oxigen, care este consumat rapid din mediu, încât dacă nu se face aerarea (prin barbotare/agitare) se vor putea dezvolta numai celulele aflate la suprafaţa mediului lichid. Bacteriile anaerobe sunt limitate în creştere datorită acumulării de compuşi de catabolism, toxici pentru celula care i-au produs. De exemplu, streptococii lactici sunt inhibaţi la creşterea concentraţiei în acid lactic.

FG - este **faza de declin** sau curba de distrugere şi inactivare metabolică a celulelor, ca urmare a lipsei de surse de nutriţie şi energie, de denaturare a componenţilor celulari în prezenţa substanţelor acumulate (alcooli, acizi ş.a), de autoliză, încât se poate produce în final sterilizarea mediului, moartea tuturor celulelor şi pierderea culturii.

Faza de declin este de obicei logaritmică (deci o proporţie constantă de celule mor în fiecare oră). O celulă se consideră că este moartă dacă prin incubare în mediu nutritiv proaspăt preparat, nu creşte şi nu se reproduce.

Parametrii de creştere ai culturilor microbiene

Creşterea în sistem închis (discontinuu)

Cunoaşterea ratei de creştere a culturilor este importantă în cercetare pentru studiul propietăţilor fiziologice a tulpinilor selecţionate şi în biotehnologie pentru stabilirea condiţiilor de reproducere când acestea sunt folosite în calitate de cultură starter sau pentru obţinerea avantajoasă a unor compuşi intracelulari.

După stabilirea experimentală a curbei de creştere se pot calcula următorii indici:

- Timpul de generaţie sau timpul de dublare.

În timpul fazei exponenţiale de creştere fiecare celulă se divide la un interval constant. Timpul mediu de generaţie (tg) este timpul necesar unei populaţii microbiene de a se dubla (ca număr de celule sau masa celulară).

Prin determinarea numărului iniţial de celule şi la anumite perioade specifice ale cultivării se mai calculează:

Numărul de generaţii în timpul t

$$n = \frac{\log N_f - \log N_0}{0,301}$$

Constanta ratei medii de creştere (K) - este dată de numărul de generaţi pe unitatea de timp (număr de generaţii/oră)

Pentru o populaţie bacteriană care a crescut de la 10^3 (N_0) la 10^9 (N_f) într-un timp de cultivare egal cu 10 ore, de exemplu, se obţin următoarele valori:

$$K = \frac{\log 10^9 - \log 10^3}{0,301 \cdot 10h} = \frac{9-3}{3,01} = 2 \text{ generaţii pe oră}$$

$$tg = \frac{1}{k} = \frac{1}{2gen/h} = 0,5 \text{ h/generaţii sau 30 minute/generaţie}$$

Timpul de generaţie variază cu specia şi cu condiţiile de mediu. În tab 10 se dau valori ale **tg** pentru unele microorganisme cultivate în condiţii optime deoarece în condiţii naturale acesta este mai îndelungat.

Tabel 10. Timp de generatie pentru microorganisme

Microorganisme	Temperatură °C	Timp de generţie (h)
Bacterii		
- Escherichia coli	40	0,35
- Bacillus subtilis	40	0,43
- Clostridium botulinum	37	0,58
- Mycobacterium tuberculosis	37	~12
Fungi		
- Saccharomyces cerevisiae	30	2
- Monilia fructicola	25	30

(după L.M. Prescott, 1990)

Randamentul de creştere exprimă cantitatea de biomasă rezultată prin consumul unui nutrient.

$$y = \frac{\text{masa formată prin creşterea microorganismului}}{\text{masa substratului consumat}}$$

Este un indice care exprimă eficienţa de conversie a nutrienţilor în material celular şi se exprimă în grame celule /gram de substrat utilizat.

Microorganismele aerobe cultivate în medii bogate în glucide pot asimila 20-50% din C glucidului existent, în timp ce în medii diluate, eficienţa creşte până la 80%.

Randamentul y creşte cu concentraţia nutrientului până când aceasta atinge o valoare în care are loc o saturare a sistemelor de transport şi rata de creştere rămâne constantă sau scade. Uneori creşterea microbiană este limitată de un anumit nutrient necesar (vitamine, şi alţi factori de creştere), în acest caz randamentul va depinde de conţinut şi va creşte cu cantitatea iniţială a nutrientului necesar prezent.

Creşterea microbiana în sistem deschis (continuu)

În sistem închis, cultivarea se face într-un volum de mediu nutritiv şi în perioada de cultivare are loc consumul nutrienţilor încât în faza exponenţială se formează câteva generaţii şi se instalează rapid faza staţionară de creştere.

În scopul menţinerii populaţiei microbiene în faza exponenţială de creştere, cultivarea se poate face în sistem deschis, cu menţinerea constantă a condiţiilor de cultură prin introducerea continuă de nutrienţi şi eliminarea produşilor de catabolism.

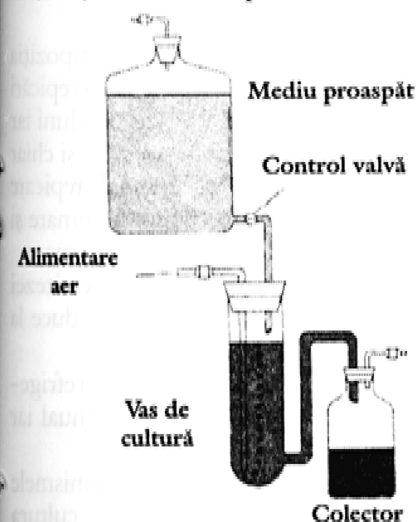


Fig. 35. Reprezentarea schematică a chemostatului

Mediul de cultură pentru chemostat conţine un nutrient esenţial (de exemplu un aminoacid) în cantităţi limitate încât rata de creştere este determinată de rata cu care se introduce mediul proaspăt şi în final densitatea celulelor depinde de concentraţia nutrientului limitant. Rata de schimb a nutrientului se exprimă prin rata de diluţie (D) şi este raportul cu care mediul este introdus în vasul de cultură şi volumul mediului din vas.

$$D = f/v$$

f=rata de curgere cm^3/h

v=volumul mediului în vas cm^3

De exemplu, $D=0,30\ h^{-1}$ dacă f este de 30 cm^3/h iar volumul este de 100 cm^3. Când D creşte şi concentraţia în nutrient este menţinută constantă, densitatea populaţiei rămâne neschimbată şi timpul de generaţie se reduce. Dacă rata de diluare este prea ridicată, celulele pot fi eliminate din vas înainte de reproducere (D este mai mare decât rata de creştere).

Un alt tip de sistem continuu de cultivare poate folosi **turbidistat** echipat cu o fotocelulă care măsoară absorbanţa sau turbiditatea culturii d vasul de cultivare. Rata de furnizare a mediului nutritiv steril este regl automat pentru a menţine constantă densitatea celulelor.

Cultivarea continuă asigură creşterea cu rata cunoscută prin menţiner celulelor în faza exponenţiala de creştere şi este utilizată în biotehnologie.

Procedee de conservare a culturilor pure

Sub formă de culturi pure sunt păstrate microorganismele aflate în stud cât şi cele care prezintă proprietăţi de biosinteză remarcabile, culturi întreţinu şi înregistrate în colecţii autorizate de microorganisme, denumite **micotec**

Dintre tehnicile aplicate pentru conservarea culturilor pure, tehnici baza pe prelungirea fazei staţionare de creştere şi evitarea etapei de declin, se cuno următoarele:

Repicarea periodică prin transfer de celule din eprubeta cu cultu pură în care mediul nutritiv este epuizat, în eprubeta cu mediu nutritiv ster cu compoziţie similară.

Intervalul de repicare este dependent de natura culturii, compozi mediului şi temperatura de păstrare. În timp ce bacteriile lactice necesită repica la intervale de 1-3 săptămâni, drojdiile se pot păstra pe slant agar 3-6 luni ia bacteriile sporulate 6-12 luni. Mucegaiurile sunt rezistente la păstrare şi chi după uscarea mediului, sporii se menţin viabili ani de zile. Procedeul de repica periodică necesită un mare volum de muncă, prezintă risc de contaminare şi este greu de realizat atunci când numărul de culturi de întreţinut este mare.

Prelungirea intervalului între două repicări prin scăderea vitez de metabolism a celulelor şi deci evitarea stării de declin ce poate duce l autosterilizare, se poate realiza prin:

- **Menţinerea culturilor la temperaturi scăzute**, în condiţii de refrigerare sau congelare. Culturile de fungi păstrate la 5°C se transferă anual ia dacă păstrarea se face la 16°C la interval de 6 luni.

- *Privarea de oxigen*. În absenţa oxigenului din aer microorganisme aerobe trec în stare latentă de viaţă. Pentru drojdii şi mucegaiuri, cultur dezvoltată în mediu solidificat (drept) se acoperă cu un strat de ulei de parafin steril; concomitent se previne şi uscarea mediului. Când celulele vii se acoper cu ulei de parafină (sterilizat în prealabil la 170°C, 2h) procesele metabolice ale fungilor decurg de 10 ori mai lent.

- *Reducerea umidităţii mediului* conduce la trecerea celulelor în stare d abioză care poate fi menţinută timp îndelungat fără a se produce modificăr racelulare, ireversibile. Bacteriile sporogene ale genului *Bacillus* se pot nţine sub formă de endospori prin antrenarea culturii în eprubete cu nisip ril şi după evaporarea apei sporii se menţin viabili adsorbiţi pe nisip, zeci de i.

- *Păstrarea culturilor în stare liofilizată* este tehnica cea mai uzitată şi avantajoasă deoarece prelungeşte cel mai mult intervalul de conservare a culturilor, fără să producă modificări ale proprietăţilor lor fiziologice. În cazul mucegaiurilor, o suspensie de spori în lapte degresat se congelează rapid la -25°C apoi are loc uscarea în vacuum timp de trei ore în recipienţi din sticlă (ampule) care se închid ermetic şi culturile se pot menţine 10 ani. Spori aparţinând genului *Aspergillus* liofilizaţi şi păstraţi astfel la 7°C şi-au menţinut viabilitatea timp de 23 ani. Bacteriile lactice sunt mai sensibile la păstrare comparativ cu fungii. Astfel pentru *Lactobacillus bifidus* liofilizat într-un mediu cu 8% zaharoză, 5% lapte şi 1,5% gel, păstrat la 4°C timp de şase luni procentul de viabilitate a fost de 60%.

În lume se cunosc colecţii de culturi, care în marea lor majoritate cuprind culturi protejate prin brevete; dintre acestea colecţia NRRL-SUA cunoscută din 1975 cu acronym **ARS** cuprinde peste 1000 de tulpini în majoritatea lor actinomicete şi mucegaiuri, **CBS Fungus Collection** (Olanda) conţine 19300 fungi ş.a.

CAPITOLUL 7

FACTORI DE CONTROL AI CREŞTERII MICROORGANISMELOR

Celula microbiană având o masă redusă este puternic influenţată d :ondiţiile mediului ambiant şi reacţionează foarte rapid la diferiţi factori, fi ›rin adaptare sau în caz contrar, prin dispariţie. Astfel creşterea microbian :ste dependentă de numeroşi factori fizico-chimici şi biologici ceea ce a condu n cursul evoluţiei la adaptări specifice prin stabilirea de interrelaţii într nicroorganisme şi mediu.

Pentru a înţelege modul în care celula microbiană reacţionează l :ondiţiile mediului ambiant, diferiţii factori au fost împărţiţi în mod arbitra n trei mari grupe, cu precizarea că în condiţii naturale bioefectul acestor ›oate fi cumulativ sau sinergic:

Factori extrinseci sunt factori exogeni, ai mediului natural/indus- ›eratură, umezeală relativă a aerului, concentraţia de oxigen, radiaţii, :canici, factori chimici.

'actori intrinseci sunt factori dependenţi de natura alimentului car ıză creşterea şi activitatea culturilor starter dar şi natura alterări a produselor alimentare (compoziţia chimică şi concentraţia în a_w, pH, rH, structura anatomică ş.a.).

'actori impliciţi sunt factori biologici determinaţi de relaţiile ce s între diferitele grupe de microorganisme care alcătuiesc microbiota ıi respectiv.

.1. INFLUENŢA FACTORILOR EXTRINSECI ASUPRA MICROORGANISMELOR

ΜPERATURA

roorganismele sunt piokilotermice, deci temperatura acestora variază mediului. Temperatura are o mare influenţă asupra proceselor ale celulei deoarece stimulează sau inhibă activitatea echipamentului ıtic. În funcţie de temperaturile posibile ale mediului natural şi ca adaptării, diferitele specii prezintă anumite **temperaturi cardinale**:

ıra minimă - temperatura la care mai poate avea loc creşterea, în schimb dacă temperatura scade sub valoarea minimă, creşterea este oprită;

temperatura optimă - temperatura la care rata specifică de creștere este maximă și **temperatura maximă** la care creșterea este încă posibilă dar prin depășirea acesteia efectul devine letal.

Domeniul general al temperaturilor cardinale pentru majoritatea microorganismelor cu implicații în industria alimentară este situat între **0°-75°C** și este mai extins în limite de (-34°)+250°C (de ex. în cazul archebacteriilor). Unele microorganisme care prezintă un domeniu restrâns al temperaturilor cardinale (eugenezice) sunt denumite *stenotermice* în timp ce microorganismele cu domeniu extins sunt denumite *euritermice*. Astfel procariotele (bacterii) au un domeniu mai extins decât al eucariotelor (drojdii, fungi filamentoși). În cadrul domeniului general al temperaturilor cardinale, în funcție de domeniul specific de creștere, microorganismele sunt separate în patru categorii:

Psihrofile - cuprinde specii care cresc bine la 0°, au o temperatură optimă la 10-15°C și maximă la aproximativ 20°C. Se consideră că aproximativ 90% din microbiota apelor prezintă temperaturi optime la aproximativ 5°C. Tolerează temperaturi negative și se consideră că temperatura limită pentru creșterea microorganismelor este -10°C. Din grupa bacteriilor psihrofile de putrefacție fac parte genurile: *Pseudomonas, Flavobacterium, Achromobacter, Alcaligenes*. Microorganismele psihrofile prezintă sisteme enzimatice active la temperaturi scăzute, conțin în membrana plasmatică o concentrație mai mare de acizi grași nesaturați (acid linoleic), ceea ce explică menținerea sa în stare semifluidă la rece și degradarea la temperaturi mai mari de 30°C. Bacteriile au tendința de a produce pigmenți și structuri extraparietale (capsule).

Psihrotrofe - sunt facultativ psihrofile, au temperatura minimă de creștere la 0°C, cresc bine la 7°C și produc prin păstrare la această temperatură, colonii vizibile sau turbiditate după 7-10 zile de păstrare. Au temperatura optimă între 20-30°C și maximă la 35-40°C. În acest grup sunt incluse bacterii din genurile: *Enterobacter, Hafnia, Yersinia, Pseudomonas, Campylobacter, Vibrio, Listeria*; drojdii din *g. Candida, g. Rhodotorula* și mucegaiuri, microorganisme ce pot da alterări ale alimentelor păstrate prin refrigerare.

Mezofile - reprezintă grupul majoritar, cu temperaturi minime la 15-20°C, temperaturi optime în intervalul 30-40°C și maximum la temperaturi peste 45°C. Cuprinde bacterii, drojdii, mucegaiuri, inclusiv microorganismele patogene pentru om/animale.

Termofile - sunt microorganisme adaptate să crească la temperaturi mai mari de 45°C și majoritatea au temperaturi optime la 55-65°C și temperaturi maxime peste 90°C. În cadrul grupului, se diferențiază microorganisme **preferențial termofile** (T_m=25-28; T_0=45-55; T_M=60-65°) din care fac parte bacterii lactice ale *g. Lactobacterium*, unii fungi precum și microorganismele **obligat termofile** (T_m=37; T_0=50-60; T_M=65-70°) din care fac parte specii

ale *g. Bacillus și Clostridium, actinomicete*. Aceste bacterii se înmulțesc m repede la 60-65°C și întregul ciclu de dezvoltare are loc în 10-12 ore. Bacteri termofile prezintă o fază „log" mai redusă, iar timpul de generație la temperatu optimă de creștere poate să fie de aproximativ 10 minute. Microorganisme termofile sintetizează enzime stabile și active la temperaturi ridicate, ca urma a unui conținut mai ridicat în aminoacizi hidrofobi (glutamină). În ARN ribosomal al bacteriilor termofile se află un procent mai ridicat al baze guanină - citozină care dau stabilitate termică. În compoziția membran plasmatice intră lipide cu acizi grași saturați, cu punct de topire mai ridicat

Microorganismele termofile sunt mai pretențioase din punct de vede nutritiv, necesitând prezența factorilor de creștere în mediu. Sunt afectate d concentrația de oxigen din mediu deoarece cu creșterea temperaturii scad solubilitatea oxigenului. Între termofili sunt incluse și specii de drojdii ale g *Candida* și peste 30 de genuri de mucegaiuri (*Mucor, Absidia, Aspergill fumigatus, Penicillium duponti ș.a.*). Sunt considerate microorganism **termotolerante** acele microorganisme care continuă să crească și la temperatur de 50°C și **termodurice** -microorganisme care supraviețuiesc prin expuner la temperaturi relativ ridicate dar nu necesită aceste temperaturi pentru creșter

Microorganismele termofile sunt folosite industrial pentru obținerea d produse lactate acide, a enzimelor termostabile, pentru purificarea apelo reziduale, ca bioindicatori pentru anumite tratamente termice. Pot produc alterarea conservelor și încingerea cerealelor.

În tab.11 se dau domenii de temperaturi pentru creșterea microbiană

Tabel 11. Temperaturi eugenezice pentru microorganisme (°C)

Microorganisme	Tminimă	Toptimă	Tmaximă
Bacterii			
Pseudomonas fluorescens	4	25-30	40
Staphylococcus aureus	6,5	30-37	46
Enterococcus faecalis	0	37	44
Escherichia coli	10	37	45
Bacillus sthearothermophillus	30	60-65	75
Fungi			
Candida scottii	0	4-15	15
Saccharomyces cerevisiae	1-3	28	40
Mucor pusillus	21-23	45-50	50-58

Efectul temperaturilor disgenezice

Dacă în condiţii favorabile de mediu prin păstrarea alimentelor în domeniul temperaturilor eugenezice, în 7 ore se pot produce prin sciziune dintr-o celulă bacteriană, peste $2 \cdot 10^6$ noi celule, în domeniul disgenezic, la temperaturi supramaximale are loc denaturarea ireversibilă si moartea fiziologică a celulelor, în timp ce la temperaturi subminimale în funcţie de regimul T°/t celulele trec în stare de anabioză îşi reduc activitatea enzimatică.

Influenţa temperaturilor subminimale

Păstrarea celulelor la temperaturi situate sub valoarea temperaturii lor minime, afectează activitatea în sensul reducerii vitezei de desfăşurare a metabolizării substanţelor nutritive şi în consecinţă scăderea producerii de proteine/enzime prin biosinteză.

Această încetinire a metabolismului exprimată prin coeficientul Q_{10} variază în funcţie de zona de temperatură, natura microbiotei şi cea a substratului nuritiv. Valoarea Q_{10} pentru majoritatea microorganismelor şi a altor sisteme biologice este de 1,5-2,5 încât o scădere de 10°C a temperaturii în domeniul subminimal duce la o scădere de 20 ori a ratei de creştere. Explicaţia constă în faptul că la temperaturi scăzute are loc o pliere a moleculelor de proteine cu formarea de noi legături între lanţurile peptidice care conduc la mascarea centrului activ al enzimei. Astfel accesul substratului la catalizator este blocat şi nu se mai desfăşoară reacţiile de anabolism/catabolism. Celulele pot trece într-o stare latentă de viaţă, respectiv starea de **psihroanabioză**. Dac temperaturile scad sub temperatura de îngheţare a apei, celula trece în stare de **crioanabioză** şi în acest caz pot avea loc modificări ireversibile de natu fizico-chimică care conduc la moartea/distrugerea celulelor.

Tabel 12. Valori minime de temperaturi pentru creştere bacteriană

Microorganisme	Temperatura minimă de creştere, °C
Vibrio	-5
Yersinia enterocolitica	-2
Enterococcus	0
Listeria monocytogenes	1
Clostridium botulinum	3,3
Salmonella	4
Staphylococcus	6,7

Degradarea ireversibilă este datorată fie cristalelor de gheaţă care formează extracelular/intracelular fie prin plasmoliză avansată ca rezultat difuziei apei din interiorul celulei în exterior unde formează cristale mari gheaţă. În condiţii de crioanabioză (congelare sub -10°C) procentul supravieţuitori se reduce, în funcţie de specie.

Cunoaşterea comportării celulelor şi a proceselor ce au loc la temperatu subminimale a condus la numeroase aplicaţii practice.

Păstrarea prin refrigerare a alimentelor la temperaturi la care nu atinge punctul lor de congelare, prelungeşte durata de păstrare a valor alimentare a produselor la zile-săptămâni. Durata este limitată de natura concentraţia microorganismelor aflate pe produs şi de gradientul temperatură. Astfel prin introducerea alimentelor calde în spaţiul de refrigera microorganismele continuă să se înmulţească la o rată impusă de viteza răcire.

Dintre microorganismele patogene, *Staphylococcus aureus* îşi reduc capacitatea de a produce toxine la temperaturi sub 18°C iar *Clostridium botulinum*, reacţionează în acelaşi mod la temperaturi sub 10°C in timp multiplicarea este oprită la temperaturi sub 3-6°C.

Yersinia enterocolitica - agent al enteritelor febrile are o frecvenţă ma redusă în carnea refrigerată. *Listeria monocytogenes* şi-a păstrat viabilitatea pri păstrare la refrigerare timp de 3 luni. *Aeromonas hidrophila* (agent al diareie se poate dezvolta la temperaturi de 3°C. Deci refrigerarea rapidă la temperatur sub 5°C reduce pericolul de îmbolnăvire dar nu e suficientă pentru a garant salubritatea alimentelor.

Păstrarea prin congelare (-10 la -60°C) nu conduce la o sterilizare produselor, deoarece microorganismele pot rămâne viabile în produsu congelat, în proporţie de 10-40% din numărul iniţial.

La congelare apa liberă şi o parte din apa legată de compuşii celulari s transformă în cristale de gheaţă, creşte concentraţia în enzime şi alţi biopolimer care generează un şoc osmotic şi se produc modificări uneori ireversibile, în conformaţia macromoleculelor.

Ca urmare a deshidratării şi scăderii indicelui a_w are loc si o dezorientare a lipidelor din structura membranei celulare, ca rezultat al slăbirii interacţiunilor hidrofobe, având ca efect creşterea permeabilităţii celulare. Din punct de vedere microbiologic dezorganizarea membranei sub acţiunea fizică a cristalelor de gheaţă are un dublu efect. Pe de o parte creşte numărul celulelor distruse, pe de altă parte conţinutul acestora reprezintă un mediu favorabil pentru creşterea celulelor supravieţuitoare, în timpul decongelării.

Bacteriile mor mai rapid în intervalul -1°-7°C iar bacteriile psihrotrofe ı -18°-26°C. Bacteriile din genul *Salmonella* pot suferi modificări letale la 3°C ... -20°C şi sunt mai puţin rezistente comparativ cu *Staphylococcus aureus* au celule vegetative de *Clostridium botilinum*, în timp ce endosporii nu sunt fectaţi de temperaturile de congelare.

Listeria monocytogenes prezentă în carnea de vită tocată, nu a fost distrusă prin congelare la -18°C în timp de 8 săptămâni. Deci congelarea nu poate fi considerată un mijloc de distrugere a microorganismelor patogene/toxicogene.

Mucegaiurile din genul Penicillium la -10°C sunt inactivate în proporţie de 35% iar la -20°C letalitatea ajunge la 90%. Procentul de supravieţuitori este influenţat de viteza cu care se produce congelarea.

Când congelarea are loc lent (3-72 ore) procentul de supravieţuitori este mai ridicat deoarece apa migrează din celulă în exterior formând cristale mari de gheaţă, nu se produce un şoc termic încât celula se adaptează şi îşi menţine viabilitatea în stare de plasmoliză. O parte din celule sunt distruse de către cristalele care cresc în dimensiuni şi cauzează rupturi ale învelişurilor celulare sau datorită prelungirii stării de plasmoliză.

Când congelarea se face rapid, mai ales până la atingerea temperaturii de -20°C, se formează cristale mici atât intracelular cât şi extracelular ce pot produce distrugerea membranei şi a componentelor celulare, blocarea metaboliţilor, şoc termic la termofile şi mezofile, încât procentul de supravieţuitori este mai mic comparativ cu cel de la congelarea lentă. Deoarece prin congelare apa legată îngheaţă greu, în timpul păstrării se produce deshidratarea, au loc pierderi de gaze O_2/CO_2 modificări de pH de până la 0,2-2 unităţi şi unele proteine sunt ieversibil denaturate. În produse congelate la -20°C indicele a_w este de 0,8 şi scade la 0.62 la temperaturi de -50°C. Din acest motiv produsele congelate au o durată de păstrare definită deoarece unele enzime de natură microbiană sau din ţesut pot să fie active; în special lipazele se menţin active până la-12°C şi dau modificări sensoriale nedorite, de exemplu în carne, îngheţată ş.a.

În funcţie de forma celulei, bacteriile cu forma sferică sunt mai rezistente la congelare decât bacteriile sub forma de bacili. Este important de subliniat că endosporii bacterieni şi toxinele ca şi bacteriile agenţi ai toxiinfecţiilor alimentare, nu sunt afectate de temperaturile din domeniul de congelare (J. Jay, 1991).

Conservarea prin congelare a alimentelor, cu menţinerea la temperaturile sub -10°C le asigură stabilitatea microbiologica şi extinde durata de păstrare de 5-50 ori, comparativ cu păstrarea prin refrigerare.

Congelarea este utilizată şi pentru păstrarea culturilor microbiene. În acest scop celulele recoltate din mediul de cultivare se suspendă într-o soluţie de glicerol, lactoză 10% sau xiloză, cu rol stabilizator, apoi se face o congelare lentă cu 1 grad/minut şi se păstrează în această stare de crioanabioză până în momentul folosirii. După decongelare, microorganismele au un timp de generaţie mai mare decât cel specific şi necesită o perioadă de activare.

Influenţa temperaturilor supramaximale.

Temperaturi care depăşesc cu 10°C temperatura maximă de creştere determină în celula microbiană denaturări ireversibile ce conduc la moartea fiziologică a celulelor ca rezultat al coagulării proteinelor, a unor procese de oxido-reducere şi a inactivării enzimelor. Enzimele la creşterea temperaturii peste valoarea maximă suferă modificări în arhitectura moleculară, au loc dezaminări ai unor aminoacizi, de exemplu a argininei care este mai sensibilă, au loc rupturi în stratul moleculelor de apă legat de moleculele proteice, se produc desfaceri ale legăturilor disulfitice şi în final are loc inactivarea ireversibilă, asociată cu distrugeri parţiale ale învelişurilor celulare. La creşterea temperaturii se produce desfacerea legăturii N-glicozidice din ADN cu formare de uracil prin dezaminarea citozinei.

Viteza de inactivare termică a celulelor microbiene este dependentă de raportul de temperatură/timp, respectiv cu cât creşte temperatura se reduce timpul necesar pentru inactivare.

Formele vegetative ale microorganismelor sunt mai sensibile decât formele sporulate. De asemenea celulele tinere, care au şi un conţinut mai mare de apă în citosol sunt mai rapid inactivate decât cele mature. Formele cu cea mai ridicaţă termorezistenţă sunt formele sporulate ale bacteriilor din *g. Bacillus* şi *g. Clostridium* care impun încălzirea la 120° timp de 5-20 minute în medii umede şi 160-180°C timp de 45-60 minute în mediu uscat, pentru a putea fi distruse.

Un factor biologic important pentru eficienţa sterilizării este concentraţia de celule în produsul supus sterilizării, deoarece denaturarea termică este un proces de prim ordin şi în fiecare fracţiune de timp se distruge o fracţiune din numărul total de celule din produs.

Dacă se exprimă matematic denaturarea termică a microorganismelor,

$dN/dt=-kN$;

$\ln N_0/N=kdt$;

$2,303 \lg N_0/N=kt$

de unde $t= 2,303.\lg N_0/n$

N_0 - număr de microorganisme la începutul sterilizării

N - număr de celule care mai pot rămâne în produs fără ca acestea să influenţeze calitatea produsului sterilizat (de la 1 la 100 celule/g)

Raportul **2,303/k**, în care k este o constantă specifică determinată practic, se notează cu **D** şi este denumit **timp de reducere decimală**, respectiv timpul c[illegible] asigură la o temperatură dată distrugerea a unui procent de 90% din t[illegible]l celulelor existente iniţial.

În tabelul 13 se dau valori ale lui D în funcţie de temperatură pentru s[illegible]nsii ale bacteriilor sporogene.

Tabel 13. Valori D (în secunde) pentru suspensii de spori/temperatură

Bacterii sporogene	105°C	120°C	130°C	140°C	150°C	160°C
Bacillus cereus	12,1	4,2	2,6	1,3	1	0,7
Bacillus subtilis	27,8	4,5	3,1	2,1	1,1	0,5
Bacillus sthearothermophillus	2857	38,6	8,8	3,9	2,4	1,4

De exemplu D_{121}°=0,6 pentru specii ale g. Bacillus şi pentru Clostridium botulinum D_{121}°=0,204. În stabilirea formulelor de sterilizare în funcţie de raportul de sterilizare dorit în funcţie de valoarea stabilită pentru D se poate calcula timpul de sterilizare la o temperatură dată.

Pentru a elimina riscul de supravieţuire a lui *Clostridium botulinum* se stabileşte raportul de sterilizare de la 10^{12} la 10 deci: 12 D = 12 x 0,204 = 2,5 min. la 121°C.

În practică se mai folosesc valori **Z** care exprimă creşterea temperaturii necesară pentru a reduce D la 1/10 din valoarea sa. Deci dacă presupunem că încălzirea se face la 111°C în loc de 121°C şi Z=10, în acest caz D_{121}°=0,204x10=2,04 iar 12 D = 24,5 minute.

În tabelul 14 se dau exemple privind rezistenţa termică a unor microorganisme pe produse alimentare.

Tabel 14. Rezistenţa termică a microorganismelor

Tipuri de microorganisme	Valori t/T° maxim, letal pentru 10^6 celule la pH 6,8 şi a_w 0,98	Specii şi genuri
Mucegaiuri şi drojdii Bacterii asporogene	30 minute la 65°C	Penicillium, Aspergillus Bissochlamys, Microbacterium, Alcaligenes, Enterococcus
Endospori bacterieni cu rezistenţa mică	10 minute la 90°C	Clostridium botulinum tipE, Bacillus macerans, Bacillus megatherium, Bac. cereus
Endospori bacterieni cu rezistenţă medie	30 minute la 100°C	Clostridium botulinum tip A, B, Bacillus species
Endospori bacterieni cu rezistenţă ridicată	10 minute la 115°C 4 minute la 120°C	Bacillus sthearothermophillus Clostridium nigrificans Clostridium sporogenes
Endospori bacterieni cu rezistenţă de excepţie	45 minute la 120°C	Clostridium thermosaccharolyticum Xezones

Aplicaţii practice ale utilizării temperaturilor supramaximale:

Pasteurizarea este un tratament termic la temperaturi sub 100°C u timp variabil, dependent de natura produsului, care asigură inactivare următoarelor celule microbiene: bacterii (în formă vegetativă) şi drojdii ş mucegaiuri (în formă vegetativă şi sporulată). Eficienţa pasteurizării este d 98-99% deoarece endosporii bacterieni nu îşi pierd viabilitatea în acest condiţii. Pasteurizarea este frecvent utilizată în industria laptelui, când se aplică un regim termic adecvat (de obicei 72°C timp de 15 sec.), care să asigure că un coeficient suplimentar de siguranţă, distrugerea bacteriilor din *g. Myco-bacterium (M. tuberculosis)* şi *Coxiella burneti* cu o termorezistenţa superioară altor bacterii patogene care se pot transmite prin lapte contaminat. În practică pentru a controla respectarea regimului de pasteurizare se determină în lapte activitatea fosfatazei, care se inactivează la temperaturi egale cu cele ale bacteriilor patogene termorezistente. Pausteurizarea se mai aplică la conservarea berii, la tratarea vinurilor cu defecte, în tehnici de laborator.

Sterilizarea este folosită în industria alimentară pentru conservarea alimentelor; formula de sterilizare se stabileşte astfel încât în mod obligatoriu să fie distruşi endosporii de *Clostridium botulinum* (4 minute la 121°C) pentru a elimina riscul de îmbolnăvire prin conserve insuficient sterilizate.

În practica microbiologică se foloseşte pentru sterilizarea mediilor de cultură cu regim mediu: 20 minute la 121°C la autoclav în mediu de vapori de apă, iar pentru sterilizarea sticlăriei în regim; 1-2 ore la 170°C sau 45 minute la 180°C. În mediu umed denaturarea proteinelor are loc mai rapid în timp ce în mediu uscat moartea celulelor are loc lent prin desicare, asfixiere, oxidare, denaturare. Sterilizarea prin flambare la roşu aplicată în tehnici aseptice pentru ansă/fir, produce moartea microorganismelor prin carbonizare.

Tyndalizarea constă în 2-3 pasteurizări repetate, alternate cu perioade în care proba este menţinută în condiţii favorabile pentru germinarea endosporilor bacterieni care devin vulnerabili şi trecând în stare vegetativă sunt distruşi la pasteurizare. Se poate folosi pentru sterilizarea mediilor ce conţin substanţe termolabile.

UMIDITATEA

Viaţa microbiană este posibilă numai când în mediul nutritiv există apă liberă care participă ca solvent, ca mediu de reacţie pentru enzimele celulare şi pentru transportul bidirecţional al produselor de metabolism. Dacă conţinutul de apă liberă intracelulară se reduce, celulele trec în stare de preanabioză, continuată cu anabioză, în care enzimele trec în stare inactivă iar mebatolismul este mult redus. În atmosferă există o umezeală relativă de 70-90% şi prin

păstrarea alimentelor, în timp, în funcție de temperatură și compoziția produsului are loc o absorbție a vaporilor de apă din aer, instalându-se o stare de echilibru, cu creșterea cantității de apă liberă și a indicelui de activitate al apei - a_w. Acesta se poate calcula cu relația:

$$a_w = P/P_0$$

în care:

P este presiunea de vapori ai apei din produs;

P_0 - presiunea de vapori a apei pure.

La starea de echilibru indicele a_w=EHR/100, unde EHR - umezeala relativă de echilibru.

Microorganismele se pot dezvolta într-un domeniu larg de a_w situat între valori de 0,62-1,00 și în funcție de adaptare în raport cu limitele de a_w se pot împărți în trei categorii:

- **microorganismele xerofite** - a_w 0,62 - 0,75 din care fac parte mucegaiuri ale g.*Xeromyces*, g. *Aspergillus*, drojdii osmotolerante, bacterii halotolerante.
- **microorganisme mezofite** - a_w 0,75 - 0,85 cuprind majoritatea fungilor, bacterii
- **microorganisme hidrofite** - a_w 0,85 - 0,99 sunt predominant bacteriile.

Cunoașterea comportării celulelor în raport cu umiditatea ca factor extrinsec ce condiționează cantitatea de apă liberă accesibilă pentru desfășurarea proceselor vitale, se aplică la conservarea prin uscare a produselor alimentare. Dacă acestea se păstrează în condiții în care crește treptat umiditatea, primele microorganisme care se dezvoltă aparțin grupului xerofitelor.

CONCENTRAȚIA DE OXIGEN

Aerul atmosferic conține aproximativ 20% oxigen. Microorganismele necesită oxigen pentru biosinteza compușilor organici și pentru desfășurarea proceselor de oxido-reducere biologice.

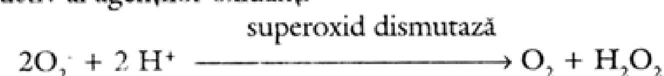
În funcție de necesarul în oxigen procurat din aer se disting 5 tipuri de comportare diferențiată a microorganismelor și anume:

- **aerobe** sunt dependente de oxigenul din aer, se dezvoltă la suprafața lichidelor, a mediilor solide. Oxigenul servește ca acceptor final de electroni transportați prin catena respiratorie. Celulele eucariote folosesc oxigenul în sinteza sterolilor și a acizilor grași nesaturați (Bacterii acetice ș.a.).
- **facultativ anaerobe**, nu necesită O_2 pentru creștere dar cresc mai bine în prezența sa. Se dezvoltă bine în medii lichide în care solubilitatea oxigenului din aer este mai redusă (Bacterii lactice ș.a.)
- **anaerobe aerotolerante** nu necesită O_2 pentru creștere și cresc la fel de bine în prezența sau absența sa. (*Enterococcus faecalis, Lactobacillus plantarum*).

- **Strict (obligat) anaerobe**, nu tolerează oxigenul și mor în prezen acestuia. Nu pot obține energie prin respirație propriu-zisă și folose fermentația sau respirația anaerobă în acest scp. (Bacterii butiric metanobacterii ș.a.).
- **Microaerofile** - aparțin microorganismelor aerobe care necesi concentrații reduse de oxigen pentru creștere, respetiv 2-10%.

Oxigenul molecular și derivații săi (H_2O_2, radicalul superoxid (O_2^-) radicalul hidroxil $(OH)^-$, reprezintă agenți puternici de oxidare ce pot distrug constituienții celulari (inactivarea de enzime prin oxidarea grupărilor - SH -SS).

Microorganismele obligat aerobe și facultativ anaerobe sunt capabile s producă superoxid dismutază, care catalizează distrugerea radicalului superoxi și catalaza care descompune apa oxigenată și astfel neutralizează efect distructiv al agenților oxidanți



$$2O_2^- + 2H^+ \xrightarrow{\text{superoxid dismutază}} O_2 + H_2O_2$$



$$2H_2O_2 \xrightarrow{\text{catalază}} 2H_2O + O_2$$

Controlul concentrației de oxigen. Oxigenul este un nutrient esenția pentru bacterii obligat aerobe. Microorganismele aerobe pot crește ușor p suprafața mediilor solide sau sub formă de voal la suprafața mediilor lichide iar sub voal condițiile devin anaerobe și creșterea este oprită.

Pentru a obține creșterea în medii lichide a microorganismelor aerobe este necesară aerarea mediului. Aceasta se realizează în laborator prin cultivarea pe agitatoare rotative iar în condiții industriale prin barbotare de aer steril dispersat în bule mici pentru a asigura o suprafață mare de contact între gaz și lichidul de cultură.

Tehnici de cultivare a bacteriilor obligat anaerobe

Microorganismele strict anaerobe pot să crească numai în medii cu potențial de oxido-reducere scăzut (...150mV) și sunt omorâte rapid dacă vin în contact cu oxigenul molecular.

Pentru a obține medii de cultură pentru anaerobi acestea conțin agenți chimici reducători: cisteină, tioglicolat, Na_2S sau ascorbat de sodiu. Odată preparate mediile, nu trebuie să vină în contact cu aerul în timpul păstrării sau folosirii lor. Se recomandă introducerea în vasul cu mediul de cultură a gazelor inerte, CO_2 sau N_2.

Culturile lichide a bacteriilor anaerobe se prepară în tuburi umplute la limită și acoperite cu dopuri de cauciuc.

ENERGIA RADIANTĂ

Lumea vie este bombardată de radiaţii electromagnetice cu lungimi de unde între 10^{-4} la 10^{6} nm în acest domeniu microorganismele sunt influenţate de următoarele radiaţii:

Radiaţii ionizante *(α, β, γ)* cu lungimi de undă mai mici de 12 nm au energie radiantă intensă ce acţionează prin ionizare cu eliberarea de ioni, radicali liberi ce acţionează prin ruperea legăturilor de hidrogen, oxidarea şi formarea dublelor legături, modificări în structură, polimerizări. În prezenţa oxigenului acţiunea radiaţiilor ionizante este amplificată prin generarea de radicali OH^{-} sunt intensificate procese de oxidare, denaturarea ADN-ului, ceea ce conduce la moartea celulei. Dintre acestea radiaţiile γ, emise de ^{60}Co au o putere mare de penetrare şi de aceea se pot folosi pentru sterilizarea ambajalelor. Eficienţa acestor radiaţii depinde de forma şi starea celulei; celulele cu forma coccus sunt mai rezistente decât formele bacilare iar formele vegetative sunt mai sensibile decât în stare sporulată. Succesiunea în sensul creşterii rezistenţei la efectul distructiv al radiaţiilor este următoarea: **bacterii Gram-negative > bacterii Gram-pozitive > fungi > virusuri**. Desi efectul radiaţiilor ionizante se manifestă asupra tuturor microorganismelor, acestea au o radiosensibilitate diferită care se poate aprecia prin determinarea valorii D_{10} (adică doza absorbită care produce distrugerea a 90% din populaţia iniţială)

În tabelul 15 se dau valori pentru D_{10} ale bacteriilor întâlnite pe alimente.

Tabel 15. Valori D_{10} pentru bacterii întâlnite pe alimente

Bacterii	D_{10} (KGy)
Clostridium botulinum	1,5 - 2,5
Escherichia coli	0,2-0,45
Lactobacillus sp.	0,8-2,2
Micrococcus radiodurans	2,1-8
Pseudomonas sp.	0,07-0,32

În funcţie de doza de iradiere se pot aplica tratamentele:

Radapertizarea - cu aplicarea unei doze de iradiere suficientă pentru a reduce numărul sau activitatea microorganismelor vii la limite care nu pot fi decelate prin nici o metodă microbiologică. În absenţa recontaminanţilor nu se produce alterarea microbiană.

Pentru a realiza sterilizarea se pot aplica doze de iradiere între 20 şi 50 Kgy (Kilogray; unitatea internaţională Gray corespunde la absorbţia unei energii de 1 joule per Kilogram de aliment iradiat).

Radicizarea - aplicarea dozei de radiaţii ionizante suficientă pentru c numărul de microorganisme patogene nesporulate să se reducă astfel încât s nu mai poată fi detectate prin analize microbiologice standardizate. În ace scop dozele trebuie să fie egale sau mai mici de 10 Kgy.

Radurizarea - aplicarea unei doze de radiaţii ionizante care nu modific produsul şi reduce sensibil numărul de microorganisme încât se prelungeşt corespunzător termenul de valabilitate al acestuia. Acest tratament se poat aplica alimentelor ambalate.

Radiaţii ultraviolete (10-400 nm).

În conditii normale pe Terra nu ajung radiaţii cu lungimi mai mici d 287 nm deoarece acestea sunt reţinute de stratul de ozon protector cu o grosim de aproximativ 40 km. Acest lucru are o semnificaţie deosebită deoarec radiaţiile uv. cu λ între 260-254 nm au efect letal sau mutagen asupra celulelo vii.

Radiaţiile ultraviolete în funcţie de doză şi starea microorganismelor a efect letal maxim la $\lambda=254$ nm şi produc degradarea triptofanului cu formare de compuşi toxici ce conduc la moartea fiziologică a celulei expuse. Dacă doz este subletală, radiaţiile induc modificări în structuraADN-ului favorizând cuplarea moleculelor de timină, informaţia genetică se transmite eronat şi s pot obţine mutanţi. Microorganismele pot să-şi refacă structura iniţială pri fotoreactivare când în prezenţa luminii sunt activate enzimele care desfac dimeri timinei, sau la întuneric când celula are capacitatea de a elimina porţiune denaturată. În practică, radiaţiile nu se pot folosi pentru sterilizarea aerului şi pentru obţinerea de mutanţi valorişi performanţi prin produşii lor de biosinteză.

Radiaţiile luminoase (1-10^{3} nm) sunt utile bacteriilor din diviziune Photobacteria. Microorganismele chimiosintetizante preferă să se dezvolte în întuneric. Dintre acestea unele microorganisme pot produce pigmenţi cu rol protector ceea ce le permite dezvoltarea în prezenţa luminii.

Radiaţiile infraroşii ($\lambda>10^{3}$ nm) acţionează prin energie calorică şi induc transformări ireversibile ale protidelor.

ENERGIA SONICĂ.

Bioefectul ultrasunetelor asupra celulei microbiene este specific şi complex depinzând de frecvenţă, intensitate, durată, densitate de celule ş.a.

Ultrasunetele cu frecvenţă mare ($\approx$ 1000 KHz) pot să acţioneze producând distrugerea fizică a celulei datorată fenomenului de cavitaţie ultrasonoră şi efectelor electrice/termice asociate. Datorită frecvenţei mari pot apare rupturi la nivelul structurilor, apar germeni de cavitaţie sub forma unor bule mici de gaz care în stadiu de comprimare rezistă la presiuni mari iar în faza de expansiune produc implozie determinând distrugeri locale.

Datorită procesului de cavitație care are loc la suprafața celulei, pot avea loc rupturi ale peretelui celular, cu modificarea arhitecturii celulare sau pot interveni schimbări la nivelul plasmalemei, ceea ce determină distrugerea în proporție de 30-50% a celulelor de drojdie.

Asupra celulei bacteriene, ultrasunetele pot cauza o detașare a moleculelor de ADN de locusurile prin care acestea se leagă de membrana plasmică.

La frecvențe mici (≈17 KHz generate magnetostrictiv) se observă efectul de stimulare al ultrasunetelor ca urmare a unor deplasări sau deformări ale unor organite intracelulare (lizozomi, mitocondrii) și modificări ale proprietăților plasmalemei cu influență asupra permeabilității și vitezei de transport a nutrienților.

Ultrasunetele de joasă frecvență și intensitate stimulează procesul de înmugurire al drojdiei *Saccharomyces cerevisiae* ca rezultat al activizării echipamentului enzimatic și a unui contact mai bun al suprafeței celulelor cu nutrienții mediului.

Tratarea celulelor de drojdie cu ultrasunete la o frecvență de 905 KHz, nu a condus la distrugerea totală a celulelor, iar celulele rămase viabile s-au caracterizat printr-o capacitate fermentativă superioară. Se presupune că prin lezarea parțială a învelișurilor celulare se eliberează enzimele intracelulare și crește viteza de fermentație. (Schmidt P., 1987; Dan V., Picu M., 1998).

Ultrasunetele se pot folosi la sterilizarea apei, a saramurilor în industria preparatelor de carne și pentru distrugerea pereților celulari în scopul extragerii unor compuși valoroși localizați intracelular.

FACTORII MECANICI

Dintre operațiile utilizate în tehnici de analiză microbiologică se aplică frecvent centrifugarea și filtrarea, în scopul separării de celule din medii lichide.

Centrifugarea este folosită pentru separarea biomasei de drojdii din medii de cultură când se folosesc viteze de centrifugare de 4000-6000 rot/min. iar pentru separarea celulelor bacteriene, viteze de 6000-12.000 rot/min. Se mai aplică lichidelor ce conțin un număr redus de celule, în vederea concentrării lor în centrifugat și controlul microbiologic.

Filtrarea realizează reținerea mecanică a celulelor microbiene atunci când diametrul porilor materialului filtrant sunt mai mici decât dimensiunea acestora. Separarea prin filtrare se mai poate realiza prin adsorbție electrostatică atunci când materialul filtrant cu sarcină pozitivă reține bacteriile cu sarcină negativă. În practica de laborator se folosește sterilizarea prin filtrare a mediilor de cultură lichide ce conțin în compoziție compuși termolabili (de ex. vitamine).

În fig. 36 se prezintă o instalație simplă de filtrare prin bujie filtrantă, cu colectarea lichidului steril în vasul A, antrenat prin absorbție datorită pompei

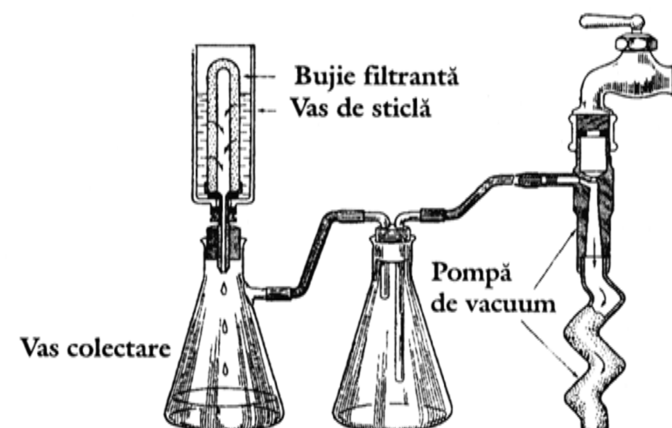
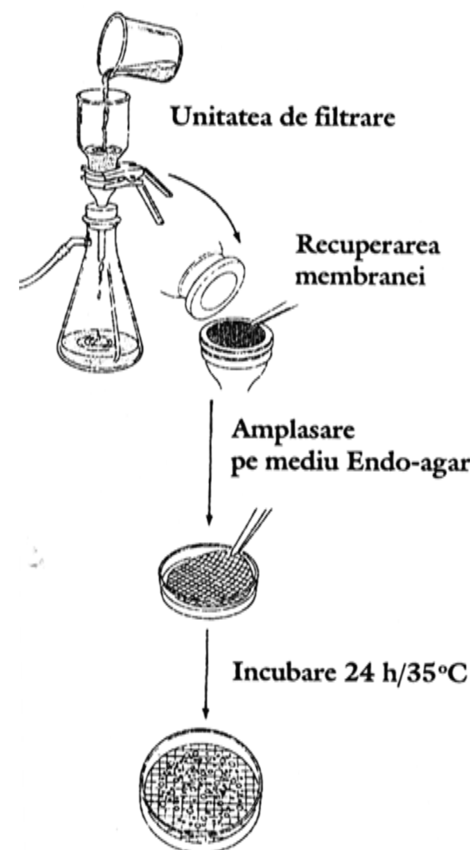


Fig. 36. Instalații de filtrare pentru sterilizarea mediilor lichide



de vacuum. Pentru rețin drojdiilor diametrul por materialului filtrant trebuie s de 0,8 μm, pentru bacterii, (μm și pentru sterilizarea apei μm.

Filtrarea se poate ap pentru determinarea număr de bacterii din apă sau alte m lichide când se face filtrarea u volum determinat din mediul analizat prin membrane filtra din acetat de celuloză, care reț celulele. După filtrare, membr poate servi pentru număra directă a celulelor sau poate transferată pe suprafața un mediu nutritiv solidificat repa tizat în placă și după termostat se numără coloniile dezvoltate

Fig. 37. Determinarea bacteriilor coliforme pe membrane filtrante

În fig. 37 se prezintă metoda de numărare a bacteriilor coliforme din ă prin folosirea de membrane filtrante.

Prin amplasarea membranei după filtrarea probei, într-o placă Petri cu ediu selectiv Endo solidificat cu agar şi termostatare, se poate face numărarea loniilor, aparţinând grupului coliform, bacterii care produc fermentarea tozei din mediu.

Agitarea se aplică la cultivarea microorganismelor în condiţii de laborator ntru obţinerea culturilor pe agitator sau la cultivarea submersă în condiţii dustriale, deoarece asigură un mai bun contact între celule şi mediul de trtiţie şi avantajează concomitent aerarea culturii.

La cultivarea mucegaiurilor în culturi pe agitator deşi este asigurat un ntact adecvat între miceliu şi mediu, în timp apar dezavantaje datorate ficultăţilor în reglarea de pH, condiţii nesatisfăcătoare de aerare şi o variaţie stadiile de dezvoltare ale inoculului încât analizele biochimice de evaluare a etabolismului culturii reflectă activitatea medie a multiplelor stări fiziologice mith J.E. et al., 1978)

Rata de agitare la cultivarea submersă în bioreactoare variază cu volumul mediu şi natura microorganismului cultivat. Astfel pentru 1-20 m^3 viteza rotaţie (rpm) este de 120-180 iar la volume de 450 m^3 poate fi de 60-120 m (Crueger W, 1990).

FACTORII CHIMICI

Substanţele chimice cunoscute prezintă o mare diversitate de compoziţie se diferenţiază în funcţie de efectul pe care îl manifestă asupra celulelor icrobiene şi anume:

- efect stimulator, benefic în concentraţii mici deoarece numeroase ubstanţe conţin elemente majore sau minore ce intră în componenţa ompuşilor celulari.
- efect de stagnare a creşterii (microbiostatic) ca rezultat al acţiunii unor ubstanţe asupra enzimelor microbiene cu rol în metabolismul celulei vii.
- efect letal (microbicid) atunci când substanţa, în funcţie de doză, conluce la modificări ireversibile şi dau distrugerea fizică a celulei sau inactivarea nzimelor, asociată cu moartea fiziologică.

Toxicitatea este caracteristica rezultată din manifestarea biologică a rganismului în care a pătruns o substanţă toxică şi este consecinţa a două eacţii şi anume acţiunea toxicului asupra celulei vii şi acţiunea celulei asupra oxicului. Din punct de vedere a toxicităţii şi a efectului produs de substanţele chimice cu efect antimicrobian acestea pot fi împărţite în patru grupe:

Substanţe chimioterapice - substanţe care au efect negativ asupra microorganismelor patogene şi nu sunt toxice pentru organismul uman la

dozele la care sunt aplicate în terapeutică. Substanţe ca antibiotice, sulfami ş.a. acţionează prin activarea enzimelor litice din lizozomi, inhibă sint peretelui celular (de ex. streptomicina acţionează prin blocarea biosinte protidelor în ribozomi), distrugerea permeabilităţii membranei plasmatice interferează dereglând biosinteza polimerazelor cu rol în sinteza acizilor nucle

Substanţe antiseptice cuprinde un grup mare de substanţe cu rol combaterea sepsiei (infecţiei). În medicină, prin antiseptici se înţeleg substanţ toxice (pe cale orală) pentru organismul uman de aceea sunt folosite pentru extern împotriva patogenilor de infecţie (stafilococi, streptococi patogeni ş.a

Substanţe conservante - sunt substanţe netoxice pentru organism uman şi în concentraţii mici au efect microbiostatic, folosiţi în industr alimentară pentru conservarea prelungită a calităţii produselor aliment Numărul conservanţilor utilizaţi în industria alimentară este limitat de OM şi FAO în funcţie de condiţiile pe care acesta trebuie să le îndeplinească anume: să prezinte un spectru larg de acţiune, să aibă putere microbiostati la concentraţii mici, să fie stabil, solubil, netoxic, economic. Conservan determină o încetinire a creşterii microbiene acţionând prin inactivarea un enzime specifice, blocarea unor căi metabolice, prelungind astfel intervalul d timp până se produce alterarea microbiană a produsului.

Substanţe dezinfectante - sunt substanţe cu efect microbicid sunt toxic pentru organismul animal şi sunt folosite în industria alimentară pent dezinfecţia utilajelor, a spaţiilor de producţie, ambalajelor, pentru unele mate prime. Operaţia de dezinfecţie are loc în mai multe etape:

- curăţirea cu îndepărtarea materiei organice de pe suprafaţa ce trebu dezinfectată.
- aplicarea soluţiei dezinfectante ce realizează decontaminarea sanitizarea. Prin decontaminare are loc distrugerrea microorganismel patogene iar prin sanitizare, reducerea microorganismelor organotrofe la limit la care activitatea lor nu prezintă risc.
- clătirea pentru îndepărtarea substanţei toxice, cu apă potabila.

Dezinfecţia nu determină o sterilizare a mediului deoarece rămâ microorganismele din apa de clătire şi nu se face o uscare pentru a evita eventuală înmulţire a acestora.

Modul de acţiune a substanţelor chimice folosite în industri alimentară. În funcţie de natura substanţei şi a microorganismelor, efect substanţelor chimice poate fi efect microbiostatic ce se manifestă prin reducer vitezei de desfăşurare a metabolismului şi oprirea înmulţirii celulelor. Ace efect este produs de către conservanţi care în funcţie de compoziţie pot s producă următoarele:

- Blocarea activităţii unor enzime: acidul benzoic, acidul sorbic inhib activitatea dehidrogenazelor

- Scăderea valorii de pH la limite disgenezice, acizii: lactic, acetic.

Dezinfectanții nu prezintă specificitate și datorită toxicității lor au aplicații limitate la decontaminarea instalațiilor, a părților lor componente, a spațiilor tehnologice, a ambalajelor și a materiilor prime. Când se aplică în faze intermediare prin doze șoc, de exemplu în industria zahărului, la tratarea zemii de difuzie (cu formol), dezinfectanții suferă transformări, se descompun și nu apar în produsul alimentar.

La aplicarea soluției dezinfectante se disting mai multe faze de acțiune. La început are loc **fixarea** la suprafața celulei (chimic sau electric), de exemplu sărurile cuaternare de amoniu au sarcină pozitivă și efectul inițial este microbiostatic. Urmează **penetrarea** prin solubilizare, modificare de structuri și în final etapa de **acționare** când în funcție de natura substanței și sensibilitatea celulei microbiene se pot produce alterări ale membranei plasmatice, influențe tensoactive, dezorganizarea echilibrului osmotic și al metabolismului.

Efectul microbicid (germicid) este produs de către dezinfectanți ce pot acționa, în general, prin:

- denaturarea ireversibilă a proteinelor și enzimelor produse de acizi, baze, săruri
- blocarea grupărilor amino din structura protidelor, aminoacizilor cu formarea de punți metilenice și inactivarea de enzime - (aldehida formică)
- permeabilizarea învelișurilor celulare, cu pierderea compușilor intracelulari și pătrunderea substanței toxice - în cazul folosirii de săpunuri, detergenți, săruri cuaternare de amoniu ș.a.

Factori care influențează efectul antimicrobian al substanțelor chimice.

Efectul unei substanțe chimice este condiționat de numeroși factori, biologici, dependenți de substanța chimică și de mediul în care aceasta acționează.

Factori biologici. Efectul unei substanțe chimice este dependent de natura microorganismelor, starea în care se află și numărul de microorganisme prezente în mediul ce urmează a fi conservat. Microorganismele sunt mai sensibile la acțiunea substanței chimice atunci când se află în stare vegetativă și mai rezistente în starea lor sporulată. Celulele tinere cu un conținut mai mare de apă liberă sunt mai sensibile decât celulele mature. Eficiența este dependentă de numărul de microorganisme în momentul utilizării, deoarece fiecare celulă absoarbe și reține o cantitate din doza adăugată. Astfel prin adăugarea unei doze constante, eficiența acesteia se reduce când încărcarea microbiană este mare.

Un factor biologic cu implicații practice este fenomenul de adaptare al microorganismelor la adaosul de substanțe chimice. În practică se pot utiliza

culturi starter adaptate la doze crescute din substanța la care alte microorganism sunt sensibile. Un exemplu ar fi folosirea de dioxid de sulf în fermentar mustului de struguri cu drojdii de cultură sulfitorezistente. Pentru a evi adaptarea microorganismelor în practică se recomandă alternarea substanțelo dezinfectante când se constată o reducere a eficienței.

Factori fizico-chimici. Fiecare substanță chimică acceptată în industri alimentară se caracterizează prin:

- **spectrul de acțiune** reflectă efectul specific sau generalizat. Astfe pentru conservanți acesta poate fi general (fungistatic) sau specific levuristatic, bacteriostatic, în timp ce pentru dezinfectanți efectul poate fi microbicid (general), bactericid, virulicid, fungicid.
- **putere antiseptică** apreciază efectul substanței chimice în raport cu o substanță etalon stabilindu-se astfel o scară de apreciere. Ca substanță etalon se folosește fenolul, cu stabilirea coeficientului fenolic.

C_f = Doza letală a fenolului/Doza letală a substanței analizate

Se prepară serii de diluții cu fenol și cu solutia dezinfectantă în analiză. Se face inocularea cu microorganismul test *Salmonella typhi* sau *Staphylococcu aureus* și se face termostatarea la 20°C sau 37°C. La intervale de 5 minute se scot probe și se inoculează în mediu nutritiv și se face incubarea timp de 3 zile. Cea mai ridicată diluție care omoară bacteriile test după o expunere de 10 minute dar nu și după 5 minute se ia în calcul pentru coeficientul fenolic. De exemplu dacă pentru fenol diluția a fost de 1:90 iar pentru dezinfectantul X egală cu 1:450, coeficientul fenolic este egal cu 5. În timp ce alcoolul etilic 70° are coeficientul fenolic egal cu 0,04, clorul gazos are valoarea 200.

Puterea antiseptică este dependentă de acțiunea temperaturii și anume cu creșterea temperaturii cu 10 grade a soluției dezinfectante puterea crește de 20 ori; de aceea în industria alimentară dezinfecția se face cu soluții la temperaturi de 60-70°, când eficiența este maximă.

Factori dependenți de mediu. Eficiența substanței chimice depinde de solubilitate și de factorii care o influențează. Substanțele chimice nu trebuie să reacționeze cu componentele mediului. Multe substanțe cu efect antimicrobian nu pot fi folosite ca urmare a faptului că reacționează cu protidele. De exemplu clorul și hipocloriții își reduc efectul antiseptic dacă se introduc în ape cu grad ridicat de impurificare.

Eficiența substanțelor conservante poate crește ca urmare a unui efect ...ergism, efect cooperant ce permite utilizarea în amestec a mai multor ...anțe în concentrații mai mici decât cele necesare pentru a avea aceeași ...nță, la folosirea lor separată.

Conservanţi şi dezinfectanţi utilizaţi în industria alimentară. Spectru de acţiune

Conservanţi chimici

Sunt acceptaţi ca aditiv un număr limitat de substanţe care nu se consum ca atare, dar în alimente măresc gradul de securitate şi stabilitatea biologică a produselor alimentare. Se cunosc 30 agenţi conservanţi cu factor de securitate egal cu 100. Dintre aceştia fac parte:

Acidul carbonic asigură conservarea limitată a băuturilor impregnate, a apei minerale, prin reducerea pH-ului la 3,5 şi inhibă activitatea bacteriilor de putrefacţie.

CO_2 în concentraţii de 10-50% este eficace şi inofensiv şi poate fi folosit la conservarea cerealelor, a cărnii.

Acidul sulfuros se disociază în SO_2 şi H^+ şi poate fi folosit pentru dezinfecţia utilajelor (1-2 g. dm^{-3}) şi drept conservant în industria vinificaţiei, la conservarea sucurilor şi marcurilor de fructe.

Acţionează în calitate de oxidant şi inhibitor al oxidazelor, previne oxidarea şi stabilizează pigmenţii antocianici, previne închiderea la culoare a mustului şi are efect microbiostatic.

Efectul antimicrobian al SO_2 se manifestă asupra mucegaiurilor şi bacteriilor aerobe şi este mai puţin evident asupra drojdiilor fermentative. Dezvoltarea majorităţii drojdiilor este întârziată la doze de 50-70 mg.dm^{-3}. Pentru drojdiile sensibile la adaos de SO_2 fac parte *Candida pulcherrima, Kloeckera apiculata, Pichia Rhodotorula*, iar dintre speciile sulfitorezistente sunt menţionate: *Saccharomyces cerevisiae var. ellipsoideus, Saccharomycodes ludwigi* şi *Schizosaccharomyces pombe*. În soluţii, anhidrida sulfuroasă, în funcţie de pH se poate afla în stare liberă (forma moleculară), stare în care efectul antimicrobian este maxim deoarece pătrunde mai uşor prin învelişul celular, fie în forme disociate (forma sulfit şi bisulfit) sau în formă legată (prin combinaţie cu aldehide, glucide reducătoare, fenoli).

Pentru obţinerea concentraţiei eficiente a formei active, în funcţie de pH în mustul de struguri sau în vinuri se adaugă doze de 200-600 mg.dm^{-3} (la pH peste 4 predomină formele neactive şi aplicarea de SO_2 nu mai este eficientă).

Unele bacterii lactice rezistă la dozele de SO_2 practicate în vinificaţie, ceea ce explică faptul că 70% din vinurile roşii şi 30% din vinurile albe pot suferi o fermentaţie malolactică spontană.

Doza limită de SO_2 admisă, fără efect toxic pentru om este de 0,7 mg.Kg^{-1} corp.zi

Acidul acetic, acţionează prin întreaga sa moleculă sau după disociere şi reduce pH-ul la valori ce conduc la dezechilibre la nivelul membranei celulare

şi modificarea schimburilor osmotice. La concentraţie de 0,5% inhi[bă] dezvoltarea bacteriilor de putrefacţie iar la concentraţii de 4% inhibă creşte[rea] drojdiilor şi mucegaiurilor. Excepţie fac fungii din genul *Geotrichum* care rez[istă] la concentraţii de 8% acid acetic şi bacterii acetice - *Acetobacter xylinum* (1[0%] ac. acetic).

Este utilizat la conservarea legumelor în concentraţii de 4-4,5%, pen[tru] obţinerea marinatelor şi sub formă de acetat de calciu 2% pentru preveni[rea] mucegăirii pâinii.

Acidul lactic acţionează prin scăderea pH-ului la valori care inhi[bă] dezvoltarea bacteriilor de putrefacţie (1,5-2%). Poate rezulta în mod natu[ral] prin fermentaţie lactică asigurând conservarea legumelor, a produselor lact[ate] acide.

Acidul propionic şi sărurile de Na/Ca au efect fungistatic şi interv[ine] prin modificarea permeabilităţii membranei plasmatice, în doze de 0,4-2[%]. Este folosit la prevenirea mucegăirii pâinii şi la conservarea cerealelor, furaje[lor] (Junghietu G.I., 1982).

Efectul antimicrobian al acizilor organici este diferenţiat. S-a stabilit [că] pentru a reduce cu 50% rata de creştere a drojdiilor care dau alterări a[le] alimentelor, concentraţia în acid propionic trebuie să fie de 20 mM, în timp[ce] pentru acidul acetic aceasta trebuie să fie de 150 mM şi respectiv al acidu[lui] lactic de 350 mM.

Acidul benzoic are efect fungistatic acţionând prin blocarea enzime[lor] participante în metabolismul oxidativ. Este utilizat ca atare sau sub formă d[e] săruri (benzoat de sodiu). Este eficient asupra drojdiilor şi mucegaiurilor [la] pH<4 în concentraţii de 160 mg.dm^{-3}. Nu este eficient asupra bacteriil[or] acetice, bacteriilor lactice şi are un efect slab asupra bacteriilor butirice.

Dintre drojdii prezintă o toleranţă ridicată *Saccharomyces bailii* care s[e] dezvoltă în medii cu 600 mg.dm^{-3} benzoat. Doza admisă nu trebuie s[ă] depăşească 5mg.kg^{-1}.kilocorp.zi

Derivaţii acidului benzoic, esteri parabenii au un spectru mai larg d[e] acţiune. Astfel metil parabenul este eficient asupra mucegaiurilor în timp c[e] propil parabenul asupra drojdiilor. Efectul antimicrobian creşte cu lungime[a] lanţului alkil.

Ester parabenii acţionează asupra bacteriilor Gram pozitive şi negative ce dau alterarea berii, în doze de până la 0,1% (Dan V. et al., 1996). Au o toxicitate redusă şi se elimină prin urină (96-100%).

Acidul sorbic sau sorbaţii de sodiu şi de potasiu se folosesc drept conservanţi în doze de 0,2% pentru efectul lor antifungic când pH-ul mediului este mai mic de 6,5. Exercită efect inhibitor optim la pH 4,5 asupra unor bacterii patogene din *g. Salmonella, Stahpyloccocus*, şi nu au efect asupra bacteriilor lactice. Acţionează prin inactivarea enzimelor dehidrogenaze din celula microbiană şi inhibă germinarea sporilor.

Acidul sorbic este asimilat de organismul uman iar doza zilnică admisă este de 25 mg.kilocorp^{-1}.zi. Este utilizat la conservarea sucurilor de fructe, a margarinei, a brânzeturilor şi a carcaselor de carne (pulverizare cu soluţie 10%).

La conservarera vinurilor dulci se adaugă în doze de 300 mg.dm^{-3}. Majoritatea drojdiilor sunt inhibate la 50-100 mg.dm^{-3} în timp ce *Saccharomyces oviformis* la 200 mg.dm^{-3}/

Clorura de sodiu are efect conservant ca urmare a reducerii de a_w şi prin eliberarea în apă a Cl^-. Acţiunea conservantă este dependentă de concentraţie astfel la 4-5% inhibă bacterii strict anaerobe, la 10% bacterii facultativ anaerobe şi mucegaiuri în timp ce bacteriile de putrefacţie sunt oprite în dezvoltare la concentraţie mai mari de 15%. Nu este eficientă şi nu controlează creşterea bacteriilor patogene sau toxicogene. (Se menţionează că *Bacillus anthracis* - agentul antraxului şi-a menţinut viabilitatea 6 luni în soluţie saturată de sare.)

Nitriţii şi nitraţii de potasiu. Din totalul de nitriţi sau nitraţi consumaţi zilnic prin aportul legumelor, a apei, a cerealelor, laptelui ş.a., 5-15% reprezintă săruri adăugate la obţinerea preparatelor de carne.

Ionul nitrat este extrem de stabil şi poate fi transformat în organism, în nitrit de către nitrat-reductaza din microbiota bucală.

Ionul nitrit este foarte reactiv şi instabil şi se poate transforma în monoxid de azot cu efect antibacterian, ca urmare a interferării cu anumite etape metabolice. Astfel nitritul inhibă bacteriile de putrefacţie anaerobe, inclusiv pe cea a lui *Clostridium botulinum* şi producerea de toxină botulinică cât şi bacteriile Gram negative (*Salmonella*). Efectul antibacterian este datorată reacţiei cu grupări a-aminice ale aminoacizilor din proteinele din citosol (inhibare tip Perigo) sau reacţiei cu grupări SH ale compuşilor cu sulf care nu mai pot fi folosiţi de microorganisme.

Efectul este mai evident la pH<5,8 şi este sinergic în prezenţă de NaCl.

Un aspect tehnologic pozitiv îl constituie reacţia dintre monoxidul de azot şi mioglobină cu care formează un pigment stabil prin oxidarea Fe^{+2} din hem.

Pe de altă parte ionul nitrit, în mediu acid formează acidul azotos care în anumite condiţii, în prezenţă de amine, poate genera **nitrozamine** ce pot fi cancerigene în proporţie de 75%.

Nitriţii în exces au efect toxic asupra organismului uman deoarece pot reacţiona cu atomul de Fe al hemului, care devine nefuncţional şi poate determina conţinutul în vitamină A şi B_1.

Experţi în aditivi alimentari ai Comitetului mixt FAO/OMS au fixat doza zilnică admisă pe care un consumator o poate absorbi zilnic pe parcursul vieţii, fără risc. Aceasta este de 5 mg nitrat şi respectiv 0,1 mg nitrit raportat la kg greutate corporală.zi. (Lenges J, 1992).

Alcoolul etilic în concentraţii de 50-70% acţionează prin coagularea proteinelor, dizolvarea lipidelor şi modificări ale tensiunii superficiale şi es folosit la conservarea fructelor de pădure. Are efect bactericid, fungicid nonsporicid (Prescott L.M, 1990)

Dezinfectanţi chimici

Acizi minerali (HCl, H_3PO_4, H_2SO_4, HNO_3) acţionează pri denaturarea proteinelor. Acidul sulfuric în concentraţii de 0,25% este folo la dezinfecţia butoaielor, budanelor în industria drojdiei, a vinului iar solu de acid fosforic 0,4% (70°C), la spălarea tancurilor în industria laptelui.

Acidul azotic produce dezaminarea oxidativă a unor baze din structur ADN şi modificări ireversibile letale.

Bazele (NaOH, $Ca(OH)_2$) ca atare în soluţii de 2-4% sau în amestec săruri (Na_2CO_3) se folosesc la curăţirea alcalină. Prin creşterea pH-ului la valo de 10-12 şi eliberarea grupărilor OH^- se produc dereglări în funcţionar membranelor. La acţiunea bazelor, bacteriile Gram negative sunt mai sensibi decât cele Gram pozitive.

Sărurile diversificate în compoziţie au o eficienţă în funcţie de natur anionului şi cationului, în următoarea succesiune descrescătoare:

Anioni - bicromat > iodat > salicilat > borat > Br > Cl > sulfat

Cationi - Ag > Hg > Cu > Ni > Zn > Fe > Mn > Sn > Ca > K, N

· Sărurile metalelor grele acţionează la concentraţii foarte reduse pri inactivarea enzimelor celulare ca urmare a legării de grupe SH şi modificare structurii terţiare şi secundare a moleculelor proteice (Matveev V.E, 1981).

Clorura mercurică poate fi folosită în dezinfecţia suprafeţelor, în laboratorul de microbiologie, la concentraţii de 0,001%.

· Sărurile cuaternare de amoniu, au efect bactericid, mai sensibile fiin bacteriile Gram pozitive (bacterii lactice, staphilococi ş.a.). Se utilizează în doze de 200-500 mg.dm^{-3} iar eficienţa lor creşte prin combinare cu dezinfectanţii acizi/bazici.

Sunt agenţi tensoactivi cationici şi produc modificări la nivelul membranei. Dintre acestea, bromocetul este folosit cu succes la dezinfecţia în industria berii, septozolul în industria zahărului, triton ş.a.

Halogenii şi derivaţii halogenaţi

Au efect bactericid în următoarea ordine crescătoare Cl < F < Br < I

Clorul este folosit pentru sterilizarea apei în doze de 1-3 mg.dm^{-3}. În apă, au loc următoarele reacţii



$$Cl_2 + H_2O \rightarrow HClO + HCl$$

Acidul hipocloros are efect microbicid maxim în forma nedisociată în zone de pH 4-7,5 şi este nonsporicid.

Ca surse de HClO poate servi hipocloritul de sodiu (10%) pentru dezinfecţia vaselor, hipocloritul de calciu, sau clorura de calciu (5-10%).



$Ca(OCl)_2 + H_2O \rightarrow Ca(OH)_2 + 2\ HClO$



$HClO \rightarrow HCl + O \uparrow$

• Cloramine (R-NHCl) au acţiune microbicidă de lungă durată. Cloramina T (toluen sulfon dicloramida) cu 30% Clor activ se foloseşte în doze de 1-2%. Sporii bacterieni au o rezistenţă de 10-1000 ori mai mare decât formele vegetative, încât prin clorinare continuă, se previne formarea endosporilor rezistenţi.

Iodul şi iodoforii, în doze de 1-1,75% Iod activ au efect microbicid şi în apă rece, se elimină prin clătire, nu sunt iritanţi şi intră în componenţa săpunurilor lichide.

Aldehide (formaldehida şi glutaraldehida). Formaldehida are acţiune bactericidă, ca urmare a formării de punţi metilenice cu grupările NH_2; OH^- din structura proteinelor celulare. Are efect virulicid şi poate să păstreze caracterele antigenice ale acestora încât este folosită la prepararea vaccinurilor.

Efectul dezinfectant este accelerat prin creşterea concentraţiei în sare. La doze de 5-8%, endosporii bacterieni sunt distruşi în 10-30 minute.

• Glutaraldehida în concentraţie de 2% este mai puţin iritantă comparativ cu formaldehida şi produce distrugerea sporilor bacterieni prin contact prelungit (12 ore).

Agenţii tensoactivi: fenolul şi derivaţii săi (creolina, lizol, eugenol, hexaclorofen) au acţiune antiseptică. Fenolul aplicat din 1867 de către Lister, în prezent este înlocuit cu dezinfectanţi mai stabili şi neiritanţi.

În grupul substanţelor care acţionează prin solubilizarea lipidelor, dezorganizarea funcţiei membranare şi pierderea compuşilor celulari acţionează şi **detergenţii** care pe lângă efectul emolient, spumant au şi efect antimicrobian.

Dezinfectanţii gazoşi se folosesc pentru dezinfecţia aerului, a spaţiilor de producţie, a ambalajelor; sub formă de gaz sau aerosoli. Pe lângă aldehida formică se mai folosesc: oxidetilenul, oxidpropilenul, bromura de metil, freoxid, ß-propionlactona.

• Etilenoxidul este folosit industrial pentru sterilizarea obiectelor din material plastic, în concentraţie de 0,5-1% la temperaturi de 0-4°C. (Stanier Y, 1977)

Pentru evaluarea gazelor dezinfectante se foloseşte coeficientul C_{T100} care reprezintă concentraţia practică a substanţei în unitatea de timp, necesară pentru distrugerea tuturor microorganismelor.

În tabelul 16 se dau valori ale acestui coeficient.

Tabel 16. Valori medii ale C_{T100} ($mg.dm^{-3}.h^{-1}$).

Decontaminaţi	Celule vegetative	Endospori în: suspensie apoasă	Endospori în: stare uscată
Formaldehidă	28	250	3500
Oxidul de etilen	2.300	16.600	32.700
Oxidul de propilen	9.200	66.500	131.000
Bromura de metil	39.000	333.000	493.000
β-propion lactona	1,1	10	13,2

(Matveev V.E, 1981)

Deşi β-propionlactona este de 25 ori mai eficientă decât formaldehida şi de 4000 ori faţă de oxidul de etilen, utilizarea sa este limitată datorită efectului toxic (cancerigen).

7.2. INFLUENŢA FACTORILOR INTRINSECI ASUPRA MICROORGANISMELOR

Factorii intrinseci se referă la diferitele componente şi structură a produselor alimentare care influenţează activitatea microorganismelor prezente pe/în produs. În funcţie de prezenţa concomitentă a mai multor factori, din totalul microorganismelor ce pot contamina produsul este favorizată activitatea unui număr restrâns, de obicei 1-4 specii care vor produce şi alterarea sa specifică.

Produsele alimentare au o compoziţie chimică foarte diversificată şi un grad de încărcare cu microorganisme foarte diferit,ce depinde de acela al materiilor prime şi auxiliare, de factorii extrinseci ce intervin la prelucrare şi păstrare.

Dintre factorii intrinseci, dependenţi de alimentul care va reprezenta substratul pentru activitatea microorganismelor (adăugate prin culturile starter sau ocazional contaminante), mai importanţi sunt:

Compoziţia chimică a alimentelor reprezintă un factor important deoarece microorganismele necesită pentru creştere surse de carbon, azot, săruri minerale, factori de creştere şi apă disponibilă. Cu cât alimentul este mai complex cu atât asigură condiţii favorabile pentru creşterea mai rapidă, a unui număr mai mare de microorgaisme şi este mai alterabil. Produsele alimentare lichide se alterează mai rapid decât cele solide pentru că celulele microbiene vin în contact direct cu nutrienţii solubili. Produsele vegetale (fructe, legume)

u un pH acid și lipsite de vitamine din grupul B sunt alterate preferențial de tre mucegaiuri care nu necesită factori de creștere și care produc enzime ce ot hidroliza poliglucidele din învelișul lor protector. Produsele bogate în lucide simple sunt de obicei fermentate cu formare de alcooli, acizi, încât rin scăderea de pH este inhibată activitatea bacteriilor de putrefacție care ecesită pentru dezvoltare pH neutru. Carnea ce conține cantități importante e substanțe azotate având un pH apropiat de neutru va favoriza dezvoltarea acteriilor de putrefacție ce pot folosi ca sursă de azot, protide. Alimentele ce onțin lipide vor fi alterate preferențial de microorganisme producătoare de ipaze: *Pseudomonas, Bacillus, Candida, Geotrichum, Aspergillus, Rhizopus ș.a.*

Structura anatomică influențează activitatea microbiană ca urmare a menținerii la distanță a microorganismelor de nutrienți accesibili. Astfel oul se alterează greu, deoarece coaja poroasă și membrana împiedică pătrunderea unor microorganisme. Semințele oleaginoase sau ale cerealelor prezintă un înveliș celulozic protector ce nu poate fi degradat decât de microorganisme celulozolitice. Prin absorbția de apă, acestea suferă mucegăirea deoarece mucegaiurile au condiții favorizante. La fructele cu înveliș ceros, greu penetrabil, alterarea intervine în zone unde se produc leziuni mecanice, înțepături de insecte ș.a.

Valoare de pH este o proprietate inerentă a unor produse naturale ce conțin cantități ridicate de acizi organici sau dobândesc aciditate prin procese fermentative dirijate (produse conservate prin murare). Microorganismele se dezvoltă în limite largi de pH (între 1,5-11). În acest interval microorganismele acidotolerante - drojdii, mucegaiuri, bacterii lactice și acetice preferă pH 2,5-5,5 și se vor dezvolta în produse acide care pot suferi fermentația și mucegăirea. Bacteriile de putrefacție care preferă un pH = 7 nu se pot dezvolta în medii acide care sunt astfel protejate. În tabelul 17 se dau valori limită de pH pentru creșterea microorganismelor în alimente.

Acțiunea pH-ului asupra creșterii se poate observa în mediu, deoarece disponibilitatea unor nutrienți este modificată de echilibrul ionic. Astfel la pH acid ionii de magneziu formează complexe insolubile, în timp ce la pH bazic sunt complexați ionii de calciu, zinc și ionii ferici, elemente cu rol de cofactori ai enzimelor microbiene. Valori extreme de pH influențează permeabilitatea membranelor celulare. În mediu acid permeazele cationice sunt saturate de ioni de H^+ care limitează sau anulează transportul cationilor indispensabili pentru celule; în mediu alcalin membrana este saturată cu OH^- și este împiedicat transferul de anioni necesari. La modificări de pH se modifică și cinetica reacțiilor enzimatice care se desfășoară optim la anumite valori specifice. Microorganismele patogene, de exemplu *Campylobacter* și *Clostridium*

sunt mai sensibile decât cele din genul *Escherichia, Salmonella, Staphyloco*... *Costridium botulinum* are pH-ul minim pentru producerea de neuroto... egal cu 4,8, iar la *Staphylococcus aureus* pH minim pentru creștere este de 4...

Tabel 17. Valori limită de pH pentru creșterea microbiană

Grupe microorganisme	Valori minime	Valori optime	Valori maxime
Drojdii	1,5-3,5	4- 6,5	8-8,5
Mucegaiuri	1,5-3,5	4,5-6,8	8-11
Bacterii	4,5	6,5-7,5	11
Staph. aureus	4,2	7-7,5	9,3
Escherichia coli	4,4	6-7	9,0
Pseudomonas aeruginosa	5,6	6,6-7,0	8,0
Bacillus sp.	5-6	6,8-7,5	9,4-10
Clostridium botulinum	4,8		8,2
Clostridium perfringens	5,5	6-7,6	8,5
Clostridium sporogenes	5-5,8	6,8-7,5	9,4-10
Acetobacter sp.	4	5,4-6,3	9,2
Bacterii lactice	3,2	3,5-6,5	8
Lactobacillus acidophillus	4-4,6	5,8-6,6	6,8
Lactobacillus plantarum	3,5	5,5-6,5	8
Leuconostoc cremoris	5	5,5-6	6,5

Valoarea de rH este dependentă de prezența în aliment a substanțelo... cu caracter oxidant sau reducător. Se poate exprima valoarea rH în funcție d... valoare de pH cu relația:

$$rH = \frac{(E_H + 0,058\ pH)}{0,029}$$

Alimentele cu potential de oxidoreducere scăzut (rH 0-12) favorizea... dezvoltarea anaerobilor, de exemplu laptele, în timp ce fructele cu rH ridica... (18,5-28) favorizează dezvoltarea microorganismelor aerobe. Diverse lichide cu valori medii de rH (12-18,5) permit activitatea fermentativă a drojdiilor, bacteriilor lactice. Potențialul de oxido-reducere E_H depinde atât de raportu... între substanțele cu caracter reducător și oxidant cât și de tensiunea de oxigen și contactul produsului cu aerul. Oxigenul influențează potențialul de

oxidoreducere din mediu şi are efect specific asupra metabolismului; în prezenţa oxigenului are loc oxidarea glucidelor, aminoacizilor, acizilor graşi, cu formarea de apă şi gaze: CO_2, NH_3, în timp ce în absenţa oxigenului se formează produse intermediare: alcooli, acizi, glicerol, acizi graşi, NH_3, H_2S. Potenţialul de oxidoreducere în volţi măsoară facilitatea cu care un mediu pierde sau câştigă electroni. Dacă pierde electroni este reducător şi potenţialul de oxidoreducere este negativ, dacă el câştigă electroni este oxidant iar potenţialul de oxidoreducere este pozitiv. În timp ce sucurile din plante au un E_H pozitiv (+200 -+300) şi sunt alterate de mucegaiuri, bacterii aerobe, brânzeturile cu E_H negativ (-20....-200) sunt alterate de către bacterii butirice anaerobe.

Indicele de activitate al apei (a_w) din produsele alimentare reflectă conţinutul de apă liberă pusă la dispoziţia microorganismelor pentru reacţii chimice, biochimice, transfer de metaboliţii prin membrane semipermeabile. Se poate calcula şi după legea lui Raoult:

$$a_w = \frac{n_2}{n_1 + n_2}$$

unde: n_1 reprezintă solutul, iar n_2 solventul

Domeniul general de a_w pentru dezvoltarea microorganismelor este 0,62-0,99; cele mai pretenţioase sunt bacteriile care necesită cantităţi mari de apă liberă, în timp ce drojdiile osmotolerante, şi mucegaiurile xerofite se dezvoltă la valorile minime ale domeniului. Între conţinutul de umiditate al produselor alimentare determinat prin uscare la etuvă la temperaturi de 105°C până la masă constantă şi indicele de a_w nu se pot stabili relaţii de dependenţă.

De exemplu,un indice a_w egal cu 0,7 corespunde la următoarele produse: lapte praf cu 7% umiditate, carne deshidratată cu 10%, legume deshidratate cu 11-22% umiditate. O soluţie de sare 7% şi o soluţie de zahăr 25% au acelaşi a_w=0,96 şi concentraţiile trebuie să crească la 23% şi respectiv 63% pentru ca acest indice să scadă la valoarea de 0,8.

În tabelul 18 se dau valori minime de a_w la care este oprită dezvoltarea microorganismelor şi produse alimenmtare cu aceste valori.

Microbiota produselor conservate prin uscare este formată din mucegaiuri ale genurilor: *Penicillium, Aspergillus, Cladosporium, Alternaria, Scopulariopsis* ; drojdii cu genurile *Hanseniaspora, Saccharomyces, Pichia*, dintre bacterii - bacteriile sporulate, bacterii lactice, micrococi. În siropuri cu a_w 0,62-0,65 se pot dezvolta drojdii osmotolerante din g.*Zygosaccharomyces*.

Astfel *Z.rouxii* are un a_w minim pentru creştere de 0,76 şi valoarea optimă este la a_w 0,85. La valori mai mici decât a_w minim se produce o moarte lentă, cu un timp de reducere decimală de 57-445 ore (la a_w 0,63).

Explicarea fiziologică a osmotoleranţei drojdiilor constă în capacitatea acestora de a sintetiza intracelular polioli (glicerol, arabitol, eritrol) atunci când a_w *este scăzut. Aceşti compuşi sunt soluţi compatibili şi* compensează

diferenţele de concentraţie de-a lungul membranei celulare şi perm funcţionarea normală a enzimelor.

Tabel 18. Valori de a_w minimale

Limite de a_w	Microorganisme	Produse alimentare
1-0,95	Bacterii Gram negative, bacterii sporulate, unele drojdii	Produse cu 20% zahăr sau 7% sare (salamuri, produse panificaţie)
0,95-0,91	Micrococi, bacterii lactice, bacterii sporulate, forme vegetative sare	Produse cu 55% zahăr sau 12% (brânzeturi, salamuri afumate)
0,91-0,87	Majoritatea drojdiilor	Produse cu 65% zahăr sau 15% sare
0,87-0,80	Majoritatea mucegaiurilor	Făinuri, orez cu 15-17% apă
0,80-0,70	Majoritatea bacteriilor halofile	Alimente cu 26% sare
0,75-0,65	Mucegaiuri xerofite	Produse cu 10% apă
0,65-0,60	Drojdii osmofile	Fructe uscate cu 15-20% apă
0,50	Nu se dezvoltă microorganisme	Caramele cu 8% apă
0,40	Nu se dezvoltă microorganisme	Produse cu 3-5% apă
0,20-0,30	Nu se dezvoltă microorganisme	Produse cu u<5%

Alimentele cu a_w între 0,62-0,85 suferă alterări datorită drojdiilor osmotolerante şi mucegaiurilor xerofile. Se conideră că un aliment prezintă garanţia stabiităţii atunci când are un a_w=0,7.

În tabelul 19 se dau valori minime ale indicelului de activitate al apei pentru unele genuri şi specii de microorganisme întâlnite pe produse alimentare.

Tabel 19. Valori minime de a_w pentru specii/genuri de microorganisme

Microorganisme	Indice de activitate al apei
Clostridium botulinum	0,95-0,97
Bacillus cereus	0,93
Staphylococcus aureus	0,9-0,85
Pseudomonas, Achromobacter	>0,95
Escherichia coli	0,95
Bacterii halofile	0,75
Saccharomyces cerevisiae	0,94
Zygosaccharomyces rouxii, rosei, mellis	0,62-0,65
Penicilium expansum	0,85
Aspergillus flavus	0,78
Aspergillus repens	0,70

Conservarea prin uscare, în soluţii de zahăr sau sare se explică prin aceea că diminuarea $a_w$ului antrenează plasmoliza celulelor microbiene. Mucegaiurile necesită un a_w mai ridicat pentru formarea de spori şi micotoxine decât cel necesar pentru germinarea sporilor sau creştere.

Este important de precizat că

• indiferent de temperatură, capacitatea microorganismelor de a creşte este redusă, când a_w este scăzut.

• domeniul de a_w la care creşterea are loc este cel mai extins la temperatura optimă de creştere.

• prezenţa nutrienţilor necesari în aliment creşte domeniul de a_w în care microorganismele pot supravieţui (Jay M. J, 1970)

În timp ce produsele conservate prin uscare suferă frecvent mucegăirea deoarece mucegaiurile necesită cele mai mici cantităţi de apă pentru germinare şi creştere, în produse cu valori ridicate de a_w alterarea este frecvent produsă de bacterii care au o viteza mai mare de reproducere şi câştigă în competiţie. Unele microorganisme se pot adapta la scăderea de a_w iar dacă produsul alimentar este păstrat la temperatura lor optimă de creştere acestea îşi extind domeniul valorilor eugenezice de a_w.

Substanţe naturale cu efecte antimicrobian. Unele produse vegetale folosite în alimentaţie conţin substanţe denumite **fitoncide**. Astfel ceapa conţine alicina, usturoiul - alil sulfonatul, de asemenea conţin fitoncide hreanul, muştarul, cuişoarele, scorţişoara ş.a. Unele fructe pot conţine benzoat, salicilat (este cazul fructelor de pădure). În produse de origine animală, în ouă este prezent lizozimul, în lapte proaspăt este prezent pe lângă lizozim, lactenine, lactoperoxidază. Desigur că aceste substanţe au un spectru specific şi pot influenţa activitatea microorganismelor sensibile.

7.3. INFLUENŢA FACTORILOR IMPLICIŢI

Inter-relaţiile ce pot apărea în condiţii naturale între microorganisme care trăiesc în acelaşi mediu sau pe acelaşi aliment sunt foarte complexe. Din cauza proprietăţilor variate ale diferitelor specii şi a intensităţii cu care decurg procesele lor metabolice, aceste relaţii au un rol important asupra vieţii microorganismelor şi indirect asupra modificărilor pe care le suferă alimentele. În biotehnologii alimentare în care se folosesc culturi mixte de microorganisme aflate într-un anumit raport cantitativ, procesul tehnologic este astfel dirijat încât să fie favorizată multiplicarea sau formarea anumitor produse de metabolism. Calitatea produselor finite şi conservabilitatea lor este dependentă de corelaţii care se stabilesc între microorganismele existente la un moment dat pe alimentul care le asigură necesităţile nutritive.

Dintre relaţiile ce se pot stabili între diferite grupe de microorganisme mai importante sunt următoarele:

Neutralismul corespunde unor relaţii de indiferenţă între două sau mai multe specii atunci când acestea se deosebesc mult prin exigenţele nutritive. Foarte puţine specii sunt strict neutrale, deobicei se formează asocieri care au caracter temporar sau accidental, reacţionând unele faţă de altele în mod favorabil şi sinergic sau dimpotrivă, antagonic.

Mutualismul (simbioza) reprezintă un tip de relaţie care permite dezvoltarea simultană pe un substrat comun a unor specii diferite care exercită una asupra alteia o influenţă bilateral favorabilă. Un exemplu îl oferă bacteriile lactice şi drojdiile folosite în culturi mixte la fabricarea produselor lactate acide, la prepararea maielelor în panificaţie. Drojdiile produc vitamine ale grupului B care sunt factori de creştere pentru bacteriile lactice iar acestea produc acid lactic care le asigură un pH optim pentru activitatea lor.

Comensalismul (metabioza) este caracterizat prin creşterea împreună a două sau mai multor specii de microorganisme aflate într-o relaţie în care una profită de asociere iar cealaltă în aparenţă nici nu profită nici nu este influenţată negativ.

Comensalismul se realizează fie prin elaborarea de către unul din parteneri a unor substanţe care favorizează dezvoltarea celorlalţi, fie prin modificarea mediului care devine mai favorabil pentru speciile asociate. Se întâlnesc frecvent la păstrarea laptelui, la fermentarea lactică a produselor vegetale, la fabricarea vinului, a brânzeturilor ş.a.

Sinergismul este o relaţie de tip cooperant în care două sau mai multe specii produc împreună un efect pe care în mod izolat nu îl pot realiza. De exemplu, putrezirea lemnului este posibilă numai prin asocierea cooperantă a mucegaiurilor, bacteriilor celulozolitice.

Antagonismul se manifestă sub forma unor corelaţii complexe între grupe de microorganisme în care una din specii se comportă ca agresor şi profită de pe urma asociaţiei cu celelalte specii care sunt prejudiciate. Se consideră că nu există microbi fără antagonişti.

Fenomenul de antagonism microbian poate fi datorat de mai multe cauze:

- Viteză diferită de creştere şi multiplicare a speciilor antagonice. Atunci când mediul conţine substanţe accesibile tuturor microorganismelor de obicei predomină bacteriile care au un timp de generaţie mai mică decât cel al fungilor.

- Insuficienţa în mediu a substanţelor nutritive. În medii cu un conţinut redus într-o substanţă utilă aceasta este consumată de specia cea mai adaptată la mediu.

- Acţiunea unor substanţe de metabolism ce pot produce un **antagonism nespecific** atunci când efectul se exercită asupra tuturor asociaţilor, de

exemplu acidul lactic format prin fermentație inhibă prin reducerea de pH activitatea tuturor bacteriilor de putrefacție, sau un **antagonism specific** când substanța produsă,(de exemplu antibiotice) au efect selectiv asupra unui grup restrâns.

În tabelul 20 se dau grupe de microorganisme aflate în relații de antagonism.

Tabel 20. Relații antagonice între microorganisme

Microorganisme patogene	Microorganisme antagonice
Clostridium botulinum	Pseudomonas aeruginosa, Bacillus subtilis, Lactobacillus sp.
Clostridium perfringens	Clostridium sporogenes, Lactobacillus sp.
Staphylococcus,	Streptococus, Pseudomonas, Enterobacter
Salmonella	Escherichia coli

Parazitismul reprezintă un tip de relație antagonică în care un microorganism se dezvoltă pe seama celuilalt. Se manifestă prin liza celulelor microbiene ca rezultat al acțiunii fagilor, (bacteriofagi, micofagi).

Cunoașterea factorilor impliciți care conditionează creșterea și multiplicarea microorganismelor aflate în produse alimentare permite alegerea condițiilor optime la utilizarea culturilor mixte și dirijarea relațiilor microbiene în scopul asigurării calității alimentelor.

CAPITOLUL 8

PROCESE METABOLICE ALE MICROORGANISMELOR ȘI APLICAȚII ÎN INDUSTRIA ALIMENTARĂ

8.1. METABOLISMUL MICROBIAN - FUNCȚII DE BAZĂ

Viața celulei microbiene în condiții compatibile este determinată de caracterele genetice care îi imprimă un anumit metabolism, determinat de totalitatea reacțiilor biochimice catalizate secvențial de enzimele celulei vii prin care se asigură transferul de masă și energie între celulă și mediul ambiant. Viața microorganismelor continuitatea lor genetică este asigurată de desfășurarea concomitentă a celor două laturi interdependente ale metabolismului și anume catobolismul și anabolismul.

Catabolismul - denumit și metabolism degradativ este rezultatul reacțiilor biochimice catalizate enzimatic prin care compușii macromoleculari sunt transformați în produși ușor asimilabili cu eliberarea concomitentă a energiei potențiale a compușilor cu rol de nutrient (reacții exergonice). Cele două funcții specifice ale reacțiilor de catabolism sunt:

- Eliberarea energiei chimice din nutrienți (sau generalizat din molecule combustibil) și stocarea acestei energii în compuși macroergici prin reacții de fosforilare, energie disponibilă pentru celula microbiană și folosită în procese vitale.

- Cea de a doua funcție care se desfășoară concomitent cu eliberarea de energie, constă în conversia substanțelor nutritive ale mediului ambiant în molecule precursori (glucide, aminoacizi, purine, pirimidine), respectiv subunități constitutive ce servesc drept material de construcție pentru biostructura compușilor celulari.

Anabolismul - metabolismul constructiv, de biosinteză, reprezintă totalitatea reacțiilor biochimice endergonice catalizate de enzime, prin care se realizează biosinteza compușilor celulari, creșterea și reproducerea microbiană.

- Funcția specifică anabolismului este cea de asamblare a subunităților rezultate prin catabolism în compuși cu rol plastic și funcțional (acizi nucleici, protide, lipide, polioze). Biosinteza acestor compuși necesită din partea celulei un consum de energie.

În cadrul metabolismului microbian are loc biosinteza și biodegradarea intracelulară a unor biomolecule de tipul proteinelor/enzimelor, care nu își

mai îndeplinesc funcțiile în mod eficient și sunt transformate în biomolecule noi prin procese de *turnover*.

Microorganismele au potențialul genetic de a codifica și de a sintetiza peste 1000 de tipuri de enzime care catalizează specific, căi metabolice proprii. Echipamentul enzimatic complex al celulei microbiene este alcătuit din enzime **constitutive** sintetizate în mod necondiționat și obligatoriu în toate celulele microbiene și **enzime adaptive** (inductive) sintetizate în mod condiționat, când mediul ambiant prin nutrienții oferiți impune adaptarea. Prin reglarea metabolismului, concentrația în enzime adaptive poate crește de 10-1000 ori în prezența substratului inductiv. Majoritatea enzimelor microbiene acționează endogen în citosol, în mediu apos sau lipidic și sunt localizate în mitocondrii pe suprafața internă a cristelor (enzime de oxido-reducere) în lizozomi (proteaze, lipaze, fosfataze), în ribozomi (ARN-polimeraza, sintetaze), în plasmalemă (permeaze) sau în stratul intern al peretelui celular (invertaza, amilaza, celulaze). Enzimele de tipul hidrolazelor acționează exogen ceea ce permite utilizarea de către celula microbiană a compușilor macromoleculari din mediu în urma conversiei lor în molecule cu dimensiuni accesibile, pentru transport în interiorul celulei.

Căi metabolice ale celulei microbiene. Pentru îndeplinirea funcțiilor de bază ale metabolismului microbian enzimele constitutive și inductibile ale celulei participă în calitate de biocatalizatori la realizarea diverselor căi ce pot reprezenta secvențe de reacții catalizate de 2-20 enzime, ce pot fi grupate în:

- **Căi catabolice** - grupează reacții degradative, de simplificare, puternic exergonice catalizate de enzime prin care moleculele mari sunt transformate etapizat în produse intermediare, iar acestea pot prin oxidare să fie transformate până la produși finali (CO_2, H_2O, alte gaze)

Degradarea catabolică se poate realiza în trei etape succesive:

- Etapa I-a are loc în exteriorul celulei prin conversia macromoleculelor (polioze, protide, lipide) în compuși simpli solubili (aminoacizi, hexoze, pentoze, acizi grași ș.a) prin care se eliberează aproximativ 1% din energia potențială a compușilor organici, energie care se pierde sub formă de căldură în mediul în care are loc reacția, fără a fi folosită de celula microbiană.

- Etapa a II-a, are loc intracelular și constă în catabolizarea parțială a compușilor simpli în intermediari metabolici cu eliberarea în mod cuantificat a 1/3 din energia lor. Această energie este folosită de celulă atât pentru biosinteză cât și pentru formarea prin fosforilare a compușilor macroergici. Pe căi catabolice cunoscute: calea glicozei, Embden Mayerhof-Pernas, șuntul pentozo-fosfat, calea tagatozei, calea Leloir, Entner Doudoroff ș.a., compușii diversificați converg spre simplificare cu formarea unor cataboliți "cheie" cum ar fi *piruvatul* metabolizat în condiții anaerobe prin fermentație în alcool, acid lactic, acid propionic, acid butiric ș.a sau în *acetil-Co-A*.

- Etapa a III-a constă în degradarea aerobă a compușilor intermediari pe o cale unică prin procese de respirație la compuși finali CO_2, H_2O, și anume prin ciclul acizilor tricarboxilici (Krebs). Această etapă este puternic exergonică, este o cale folosită de microorganismele aerobe deoarece prin metabolizarea completă până la CO_2 și H_2O a unei molecule de glucoză, celula poate să stocheze o cantitate importantă de energie.

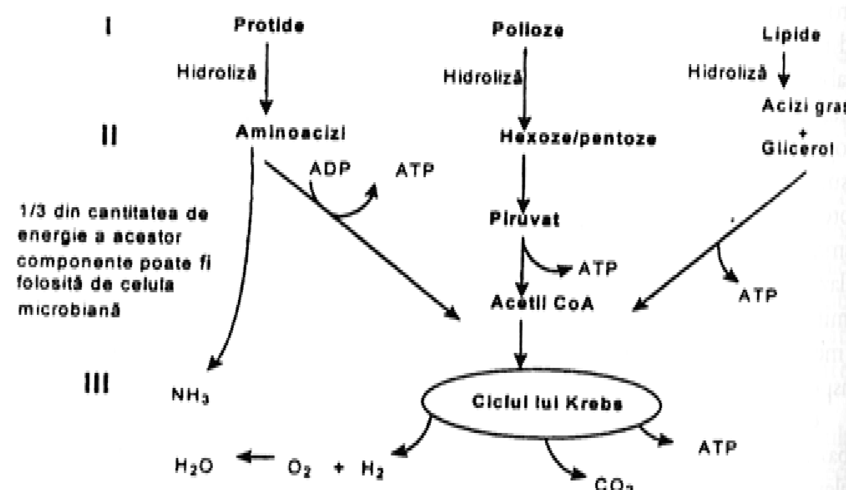


Fig. 37. Etape ala metabolismului microbian.

Căi anabolice: sunt căi biosintetice prin care celula folosește compuși simpli pentru construcția de biomolecule ce intră în structura înalt organizată a celulei. Caracteristic acestor căi este că sunt consumatoare de energie eliberată la un moment dat precum și după necesități, a energiei stocate în compuși macroergici.

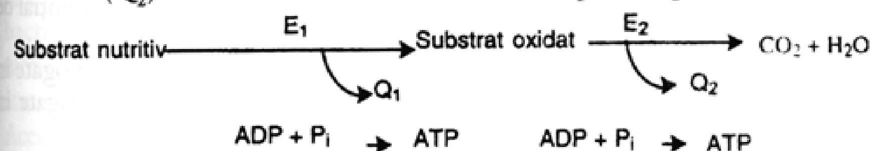
Căi amfibolice evidențiate de Davis 1961, constă în desfășurarea simultană a proceselor de degradare și biosinteză, ceea ce explică transformările rapide care se produc în celula microbiană în condiții optime de viață.

Căi anaplerotice (colaterale) -sunt căi aternative ce pot fi folosite de celulă atunci când accidental s-a produs inhibarea sau blocarea căii metabolice centrale.

8.2. BIOENERGETICĂ MICROBIANĂ (METABOLISM OXIDATIV ENERGETIC)

Procurarea energiei este o proprietate vitală a celulei microbiene și se realizează prin eliberarea energiei chimice a diferitelor alimente și formarea compușilor macroergici prin procesul de fosforilare.

În metabolismul energetic substratul nutritiv prin procese de oxidare şi oxido-reducere pe cale enzimatică trece în substrat oxidat cu eliberarea de energie potenţială (Q_1) substratul oxidat rezultat cu o energie potenţială diminuată (Q_2) suferă în continuare transformări până la produşii finali.



Substratul oxidat poate servi drept precursor sau dacă nu este util celulei, se poate elimina în mediu sub formă de catabolit. Cantitatea de energie obţinută prin catabolism, poate fi folosită direct în biosinteză, iar energia escedentară este stocată în compuşi macroergici prin procesul de fosforilare denumit astfel deoarece componenta macroergică care stochează energia rezultată, conţine grupări fosfat. Principalii compuşi macroergici sunt: ATP considerat valuta energetică forte a celulei, format din AMP~P~P (cu eliberarea a 30 kJ/mol prin desfacerea legăturii macroergice); acetil fosfatul (Acetat~P); ADP.

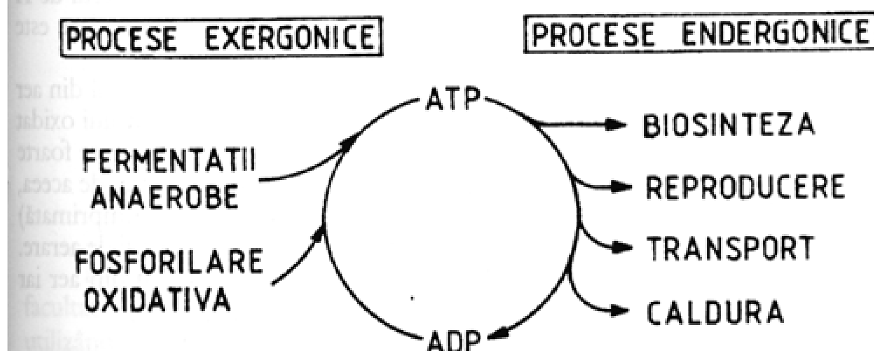


Fig.38. Procese metabolice cu participarea ATP

Fosforilarea poate fi de trei tipuri:

- Fosforilarea fotosintetică întâlnită la bacterii din diviziunea Photobacteria care folosesc energia radiantă;
- Fosforilare oxidativă când form.:rea compuşilor macroergici cu fosfor are loc prin înmagazinarea energiei eliberate prin reacţii d oxidare. Fosforilarea oxidativă are loc prin procese de respiraţie aerobă şi anaerobă.
- Fosforilarea de substrat în urma formării de compuşi macroergici prin reacţii de oxido-reducere prin care glucidele sunt transformate prin procese de fermentaţie anaerobă în compuşi intermediari, şi acceptorul de H sau electroni este un compus organic.

Prin fosforilarea oxidativă eliberarea energiei potenţiale din diverse substraturi de natură organică se realizează prin procese de oxidare care se pot desfăşura pe trei căi, astfel:

- Reacţii de oxidare prin pierdere de e^- are loc transfer de electroni de la substanţe cu potenţial de oxido-reducere negativ la substanţe cu potenţial de oxido-reducere pozitiv.

Dacă ne referim la potenţialul redox al diferitelor medii, cele bogate în oxigen pot avea valori pozitive (maxim E_0'=+0,82) iar mediile bogate în hidrogen au un potenţial negativ (maxim E_H'= -0,41)

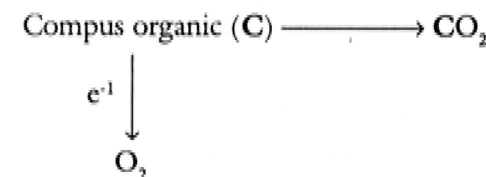
- Reacţii de oxidare prin transfer de e^- şi H^+,prin transfer de H. Oxidarea prin transfer de hidrogen este folosită de microorganisme anaerobe şi aerobe şi acest transfer este realizat de enzime active la diferite valori ale potenţialului de oxido-reducere. Astfel enzimele implicate în reacţii de oxido-reducere sunt dehidrogenazele aerobe (aldehid-dehidrogenaza); anaerobe (alcool-dehidrogenazele).

Aceste dehidrogenaze au drept coenzime NAD^+ sau NADP astfel încât acestea pot să preia atomii de hidrogen trecând din forma oxidată (NAD^+) în forma redusă ($NADH + H^+$)

- Reacţii de oxidare prin câştig de O_2 - când în prezenţa enzimelor care acţionează la un potenţial de oxido-reducere pozitiv, are loc transferul de H acceptat de O_2 din aer şi se formează apa; această reacţie de oxidare este caracteristică microbiotei aerobe.

Respiraţia aerobă este un metabolism dependent de oxigenul din aer iar produsele finale sunt CO_2 şi apa iar întreaga energie a substratului oxidat se eliberează prin produsele finale ale respiraţiei. Respiraţia arobă este foarte avantajoasă din punct de vedere energetic pentru celula microbiană, de aceea, atunci când urmărim obţinerea de celule în cantităţi mari (drojdie comprimată) sau obţinerea de substanţe intracelulare, cultivarea se face în condiţii de aerare.

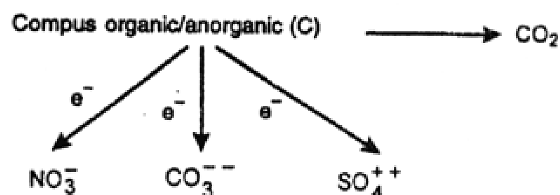
Respiraţia aerobă este dependentă de cantitatea de oxigen din aer iar carbonul din compusul organic se regăseşte în dioxidul de carbon.



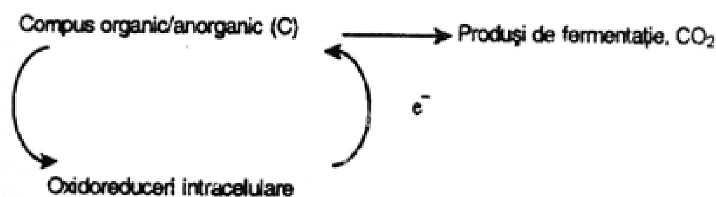
Microorganismele aerobe dispun de o catenă respiratorie diversificată în componenţa căreia intră dehidrogenaze, citocromi, citocrom-oxidaze, oxidaze. Numeroase bacterii pot oxida hidrogenul *(Pseudomonas)*, amoniacul până la NO_2 *(Nitrosomonas)*, sulful şi H_2S până la sulfat *(Thiobacillus)* sau fierul Fe^{2+} la Fe^{3+} *(Tthiobacillus ferooxidans)* cu rol important în circuitul natural al elementelor.

Respiraţia anaerobă - substratul este transformat până la CO_2, iar e^- sunt cedaţi prin procesul de oxidare a unor compuşi anorganici acceptori.

Această respiraţie este întâlnită la bacteriile strict anaerobe când acceptorul de electroni sau de hidrogen este un compus anorganic. Astfel bacteriile denitrificatoare pot transforma NO_3 la azot molecular, cele metanogene pot transforma dioxidul de carbon cu formare de metan, bacteriile acetogene ale g. *Clostridium* pot transforma dioxidul de carbon la acid acetic. Aceste bacterii obţin o cantitate mică de energie şi pot creşte în absenţa oxigenului molecular, la un potenţial de oxidoreducere de -0,2 -0,3 v. Ţinând cont că mediile ce vin în contact cu O_2 au un potenţial redox de +0,2; 0,4 atunci când pH=7, pentru a asigura dezvoltarea anaerobilor, în mediu se adaugă substanţe cu caracter reducător ca tioglicolat de Na, cistein-SH sulfura de Na. Substanţele reducătoare permit menţinerea unui potenţial de oxido-reducere scăzut şi are loc dezvoltarea anaerobilor în plăci Petri, în contact cu aerul. Pentru cultivarea anaerobilor se pot folosi şi vase speciale numite anaerostate în care O_2 este legat chimic, sau cultura se menţine în atmosferă de gaze inerte (CO_2, N_2)



Metabolismul oxidativ anaerob poate fi întâlnit şi la microorganisme facultativ anaerobe. Aceste microorganisme au capacitatea de a creşte aerob utilizând oxigenul din aer (respiraţie aerobă) sau anaerob utilizând compuşi organici ca acceptori finali ai electronilor produşi prin catabolism.



Microorganismele facultativ anaerobe în condiţii aerobe îşi adaptează echipamentul enzimatic pentru procese de oxidare la produşii finali, utilizând preferenţial oxigenul când este disponibil, datorită cantităţii mai mari de energie în cursul respiraţiei (36 moli ATP/mol glucoză asimilată faţă de 2-3 moli ATP/mol glucoză fermentată).

Putem considera celula microbiană ca o fabrică biochimică autonomă care prelucrează nutrienţii având un avantaj din această prelucrare: obţinerea de energie şi de compusi rezultaţi din prelucrare care nu sunt necesari sunt eliminaţi din fabrică (celulă).

Microorganismele, în timpul fazelor ce alcătuiesc ciclul lor biologic se pot afla în:

Trofofază - în care căile amfibolice funcţionează preponderent energetic (respiraţie) şi plastic (acumulare de biomasă) este faza care corespunde metabolismului primar.

Idiofaza - este starea fiziologică în care căile metabolismului primar sunt comutate la biosinteza produşilor metabolici secundari.

În cursul acestor prelucrări metabolice în funcţie de stadiul de dezvoltare a celulei rezultă produşi de metabolism care pot fi împărţiţi în:

- **produşi primari de metabolism** - care se formează în stare activă de creştere exponenţiala a celulei (trofofaza) şi care sunt produşi esenţiali pentru celulă. Dintre produşii rezultaţi prin catabolism au valoare economică: alcoolii, acizii, sau prin anabolism: protide, enzime ş.a.
- **produşii secundari** - apar în faza de declin (idiofază) şi nu sunt esenţiali celulei: toxine, alcaloizi.

Aceşi produşi de metabolism se formează în mod natural în diferite habitaturi în care trăiesc şi s-au adaptat microorganismele sau în mod dirijat în condiţii industriale pentru obţinerea produselor de metabolism microbian cu valoare economică.

Procesele fermentative ale microorganismelor utilizate în industria alimentară pot fi împărţite în:

Tabel 21. Fermentaţii microbiene

Fermentaţii anaerobe, propriu-zise:/produse de fermentaţie	Microorganisme selecţionate	**Fermentaţii oxidative/** produse de fermentaţie	Microorganisme selecţionate
Alcoolică (alcool etilic şi dioxid de carbon	Saccharomyces sp.	Acetică (acid acetic, H_2O)	Bacterii: Acetobacter
Lactică (acid lactic, diacetil)	Bacterii: Lactobacillus, Lactococcus	Gluconică (acid gluconic)	Gluconobacter Aspergillus niger
Propionică (acid propionic, acetic, CO_2)	Bacterii Propionibacterium	Citrică (acid citric)	Aspergillus niger
Butirică (acid butiric, CO_2, H_2	Bacterii: Clostridium	Oxalică, fumarică	Mucegaiuri.

8.3. FERMENTAŢIA ALCOOLICĂ

Fermentaţia alcoolică este un proces anaerob prin care glucidele fermentescibile sunt metabolizate prin reacţii de oxido-reducere sub acţiunea echipamentului enzimatic al drojdiei în produşii principali (alcool etilic şi CO_2) iar ca produşi secundari: alcooli superiori, acizi, aldehide ş.a.

Agenţii tipici ai fermentaţiei alcoolice sunt drojdiile genului *Saccharomyces* care pot prin fermentarea glucidelor să producă mai mult de 8° alcool etilic.

Fermentaţia alcoolică este un proces întâlnit la numeroase microorganisme, dar care produc prin fermentare cantităti mai reduse de alcool etilic comparativ cu drojdiile. Astfel mai pot produce alcool etilic bacteriile: *Bacillus macerans, Cl. acetonoetilicus, Zymomonas*) dar ele nu sunt considerate agenţi tipici .

Proprietăţi biotehnologice ale agenţilor tipici de fermentaţie

Pentru a putea fi folosite în practică drojdiile genului *Saccharomyces* sunt studiate şi selecţionate în funcţie de unele proprietăţi care le recomandă pentru utilizare industrială, cum ar fi:

Puterea alcooligenă care se referă la concentraţia mare de alcool ce se poate acumula când în mediu există un exces de zahăr. Drojdiile sunt sensibile la creşterea concentraţiei în alcool şi în timp ce drojdiile cu putere alcooligenă slabă (*Kloeckera, Torulopsis*) sunt inhibate la o concentraţie în alcool de 4-6° drojdiile de vin şi spirt (*Saccharomyces cerevisiae var. ellipsoideus, Saccharomyces cerevisiae-cerevisiae*) au o putere alcooligenă mare şi produc fermentaţie alcoolică până se acumulează 16-18° alcool.

Alcoolorezistenţa se referă la capacitatea drojdiei de a continua fermentaţia la creşterea concentraţiei de alcool şi de a demara fermentaţia în prezenţă de 8% alcool.

Sulfitorezistenţa este o proprietate importantă a drojdiilor de vin care se pot adapta la concentraţii de 200-500 mg $SO_2 \cdot dm^{-3}$ care pot influenţa negativ activitatea altor drojdii din must neadaptate (peliculare sau oxidative), ca urmare a scăderii potenţialului de oxidoreducere.

Se presupune că rezistenţa la SO_2 este datorată şi capacităţii acestor drojdii de a excreta aldehidă acetică ce poate lega SO_2 care astfel îşi reduce efectul levuristatic.

Capacitatea de floculare şi pulverulenţa - proprietăţi datorate structurii peretelui celular şi a modificării de pH şi rH din timpul fermentaţiei. Drojdiile floculante pot forma asociaţii ce se depun mai uşor, în timp ce drojdiile pulverulente se menţin mai mult timp în suspensie şi produc o fermentaţi mai avansată. Pentru drojdiile de şampanie se urmăreşte ca aceasta să se depun uşor în gâtul sticlei şi prin operaţia de degorjare să se separe sedimentul obţinându-se o şampanie limpede.

Osmotoleranţa se referă la capacitatea drojdiilor de a produc fermentaţia în mediu cu concentraţie crescută de zahăr. Aceste proprietăţi sunt recomandate drojdiilor folosite la obţinerea spirtului din melasă cu un randament superior în alcool etilic.

Frigofilia este o adaptare a drojdiilor de a produce fermentaţia la temperaturi mai scăzute 10-15°C; astfel sunt evitate fermentaţii secundare iar vinul conţine mai multe substanţe de aromă.

Caracterul killer este întâlnit la unele drojdii capabile de acumula intracelular o toxină cu efect inhibitor asupra altor drojdii sensibile. În selecţionarea drojdiilor de vin culturile care au caracter k dau randamente superioare deoarece în cursul fermentaţiei se produce o autoselecţie naturală (Anghel I et.al., 1991).

Factorii care influenţează dinamica fermentaţiei alcoolice

Fermentaţia alcoolică în condiţii industriale foloseşte substraturi naturale bogate în zahăr fermentescibil, iar viteza de fermentare şi transformarea glucidelor în produşi primari şi secundari este dependentă de numeroşi factori care pot fi împărţiţi în două mari categorii: factori biologici, dependenţi de microagenţii fermentării, şi factori fizico-chimici, dependenţi de compoziţia mediului supus fermentării şi condiţiile mediului ambiant.

Factorii biologici. Încă din 1885-1887 a fost stabilit de către Ed. Büchner că fermentaţia alcoolică este cauzată de enzimele elaborate de celula de drojdie, stabilindu-se natura enzimatică a fermentaţiei.

Complexul zimazic acelular obţinut prin mojararea celulelor de drojdie este format din 15 enzime care catalizează în diferite etape, procesele de oxidoreducere ale glucidelor fermentescibile şi în final formarea de alcool etilic.

Enzimele cele mai importante sunt dehidrogenazele: glicerat-dehidrogenaza şi alcool dehidrogenaza care au drept coenzimă NAD^+, cu rol în transfer de hidrogen în reacţiile de catabolism.

Fermentaţia decurge activ când celulele de drojdie sunt în faza exponenţială sau la începutul fazei staţionare de creştere, în timp ce drojdiile autolizate, ca rezultat al hidrolizei proteinelor intracelulare şi inactivarea enzimelor, îşi pierd proprietăţile fermentative. Viteza de fermentare depinde şi de **numărul de celule/cm³** mediu; viteza creşte cu numărul de celule, prin viteză înţelegând conţinutul de alcool format la 100 ml lichid în unitatea de timp. În practică această concentraţie este bine stabilită din raţiuni economice şi concentraţia de celule pentru declanşarea rapidă a fermentaţiei este 10^6-10^7/cm³, prin folosirea culturilor starter în industriile fermentative.

Un alt factor îl constituie **spectrul de fermentare al glucidelor**. Din studiul caracterelor fiziologice se cunoaşte că drojdiile produc fermentarea unui număr limitat de glucide şi între specii există diferenţe.

Drojdiile fermentative au un spectru limitat de glucide ce pot fi transformate în alcool etilic şi CO_2 în condiţii anaerobe.

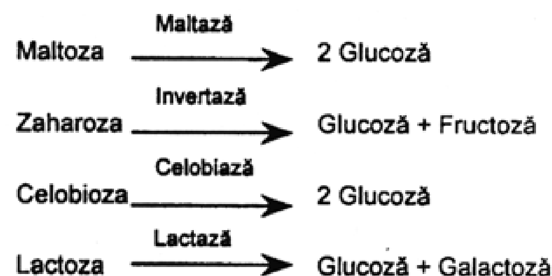
Astfel toate tulpinile de *Saccharomyces cerevisiae* pot fermenta D-glucoza, D-manoza şi D-fructofuranoza (fără să poată folosi D-fructopiranoza) şi să le asimileze în condiţii aerobe când acestea reprezintă sursa unică de carbon.

Majoritatea tulpinilor utilizează şi următoarele glucide:

Anaerob: D-galactoza, zaharoza, maltoza, rafinoza.

Aerob: D-galactoza, zaharoza, maltoza, rafinoza. În aerobioză, după epuizarea glucidelor pot asimila alcoolul etilic.

Diglucidele: maltoză şi zaharoză întâlnite în medii naturale, sunt hidrolizate de către enzimele drojdiilor, în glucide simple:



Spre deosebire de membrana plasmică, peretele celular al drojdiei este permeabil pentru glucide. Se estimează că fluxul de transport al D-glucozei prin membrana plasmatică a lui *Saccharomyces cerevisiae* în timpul creşterii este de 120-240 n.mol min^{-1} $(mg.su.drojdie)^{-1}$

Permeazele pentru transferul D-glucozei, D-manozei şi D-fructozei sunt constitutive şi asigură transferul prin difuzie facilitată în timp ce transportul pentru D-galactoză este inductiv.

Zaharoza şi rafinoza sunt hidrolizate sub acţiunea invertazei situată la nivelul peretelui celular dar există evidenţe privind existenţa unui transportor specific pentru zaharoză. Se cunosc 2 forme de invertază şi anume o invertază localizată în spaţiul periplasmic care este responsabilă pentru hidroliza extracelulară a zaharozei şi o formă secundară de invertază, intracelulară.

Invertaza este supusă represiei de către glucoză încât dacă D-glucoza este disponibilă în mediu nu poate fi pusă în evidenţă activitate invertazică extracelulară.

Maltoza este hidrolizată intracelular după ce are loc o absorbţie specifică de către maltozopermează, acţionează apoi maltaza (α-glucosidaza) ambele enzime sunt inductibile (Zimmerman F.K, Entian KD, 1997).

Datorită importanţei pe care o prezintă alcoolul etilic de fermentare în practica industrială, în afara glucidelor fermentescibile se pot folosi substraturi naturale ce conţin poliglucide (amidon, celuloză) care sunt hidrolizate în prealabil pe cale chimică sau enzimatică până la formarea de glucide fermentescibile.

Această zaharificare este obligatorie deoarece drojdiile de fermentare nu produc amilaze/celulaze şi nu pot produce hidroliza enzimatică a poliglucidelor.

Un alt factor biologic este corelat cu comportarea drojdiilor fermentative în funcţie de accesul oxigenului în mediul supus fermentării. În condiţii anaerobe, prin imersare în must, celulele de drojdie produc fermentarea glucidelor obţinând o cantitate mică de energie (2 moli ATP/mol glucoză fermentată). De aceea, ele trebuie să prelucreze o cantitate mai mare de zahăr pentru a obţine energie, iar creşterea numărului de celule are loc foarte lent.

Dacă mediul de fermentare este puternic aerat, atunci are loc *efectul Pasteur*, prin care se observă conversia fermentaţiei în respiraţie deoarece în prezenţa oxigenului, oxidarea se face până la produşi finali (CO_2 şi H_2O), iar cantitatea de energie este mult mai mare, pentru acelaşi echivalent energetic consumându-se o cantitate mai mică de zahăr.

1 mol glucoză ⟶ 2 ATP (fermentaţie)

1 mol glucoză ⟶ 36 ATP (respiraţie)

În 1876 L. Pasteur a arătat că creşterea drojdiilor este diferită în funcţie de condiţiile de aerare.

În condiţii aerobe de creştere, proporţia între zahărul asimilat şi greutatea biomasei de drojdie rezultate a fost de 1 : 176 în timp ce în condiţii anaerobe acesta a fost de 1 : 4.

Astfel s-a stabilit influenţa oxigenului asupra eficienţei de utilizare a zahărului.

În practica vinificării, atunci când fermentaţia decurge lent, ca rezultat al prezenţei în mediu a unui număr mai mic de celule, se poate stimula creşterea de celule prin aerare. În industrii fermentative (spirt, vin, bere) nu se urmăreşte obţinerea de biomasă celulara, de aceea condiţiile sunt anaerobe, astfel încât o cantitate mai mare de zahăr este transformată în alcool etilic, iar cantitatea de drojdie reziduală la sfârşitul fermentării este în cantitate mai mică.

Procesul de aerare este folosit la cultivare atunci când interesează obţinerea unei cantităţi mai mari de drojdie (drojdie comprimată sau drojdie furajeră).

Efectul Pasteur este mai evident la specii de drojdii la care glicoliza este mai puţin eficientă, în timp ce pentru drojdiile cu metabolism fermentativ puternic, acest efect este mai puţin important, deoarece enzimele ce intervin în respiraţie (aerobă) sunt supuse represiei în prezenţa glucozei din mediu.

Sacch. cerevisiae, în condiții strict anaerobe nu crește mai mult de 2-3 generații. Drojdia necesită cantități reduse de oxigen pentru sinteza de steroli cu rol de intermediari în biosinteză. În absența oxigenului, mediul trebuie să fie suplimentat cu ergosterol și acizi grași pentru continuarea creșterii celulare.

Fermentația alcoolică este influențată și de factori chimici și fizici, care acționează atât asupra vitezei de fermentare cât și asupra bilanțului masic și a raportului dintre produșii primari și secundari.

Influența factorilor fizico-chimici asupra fermentației alcoolice

Compoziția mediului de fermentare. Diferitele componente ale mediului pot fi metabolizate în mod diferit. De aceea, mai ales la vinuri, în funcție de calitatea mustului, care este influențată de soiul și gradul de coacere a strugurilor, apar diferențe de aromă.

Concentrația în zahăr influențează direct proporțional viteza de fermentare atunci când se situează în limitele 5-12% (50-120 g zahăr/dm^3). Cu creșterea concentrației de zahăr anumite drojdii mai sensibile suferă o inhibare în activitate prin procese de represie catabolică sau prin modificări la nivel de membrană datorate plasmolizei. Drojdiile de fermentare au în general o osmotoleranță și de aceea produc fermentarea în bune condiții a mustului de struguri cu o concentraie de 170-250 g zahăr.dm^{-3}.

În fermentația alcoolică industrială se folosesc diferite produse bogate în zahăr, medii naturale ce conțin și alte substanțe necesare pentru menținerea activă și nutriția celulelor.

- Astfel, dacă mustul de struguri este folosit ca lichid fermentescibil la fabricarea vinului, la fabricarea berii se folosește mustul de malt ce conține maltoză (80% din substanța solubilă).
- În industria spirtului și la obținerea drojdiei comprimate se folosește ca mediu de bază melasa, care are un conținut de 45-55% zaharoză necristalizată.
- Plămezile amidonoase pentru a putea fi folosite în fermentație trebuie să sufere mai întâi o hidroliză enzimatică în urma căreia se obține glucoză, maltoză, dextrine cu molecule mici, care sunt apoi transformate în alcool etilic.
- Zerul rezultat la fabricarea brânzeturilor, cu un conținut de 4,7% lactoză, poate fi folosit la obținerea de alcool etilic folosindu-se drept agenți de fermentare drojdii din genul *Kluyveromyces* producătoare de lactază.
- Celuloza poate fi folosită drept substrat la obținerea alcoolului carburant după hidroliză chimică și/enzimatică din care rezultă celobioză și celodextrine ce pot fi fermentate de către drojdii.

- **Concentrația în alcool.** În mediile fermentative cu microbiotă naturală, dacă se ajunge la o concentrație alcoolică de 4-6°, se produce o încetinire a fermentării la drojdii care nu au rezistență la alcool (*Kloeckera, Torulopsis, Hansenula*), iar fermentarea este continuată de drojdii alcoolorezistente, acumulându-se 18-20° alcool (1grad alcoolic = 1g. alcool absolut/100 ml).

La creșterea concentrației în alcool se poate produce o solubilizare a lipidelor situate la nivelul membranei plasmatice, crește permeabilitatea la ioni și metaboliți cu molecule mici și este inhibat transportul (absorbția) glucidelor. Alcoolul poate acționa ca un denaturant al proteinelor și de inactivare a enzimelor.

Sensibilitatea drojdiilor la efectul de inhibare dat de alcool crește cu creșterea temperaturii.

Drojdiile din genul *Saccharomyces (Saccharomyces cerevisiae)* prezintă o toleranță la acool determinată genetic.

PH-ul are un rol important în formarea compușilor de fermentare, în funcție de pH cunoscându-se două forme ale fermentării: **fermentarea alcoolică propriu-zisă**, ce se desfășoară la pH 3,5-5 când produsul principal este alcool etilic și dioxidul de carbon, cu produși secundari în cantități mici, echilibrate și **fermentarea la pH alcalin**, când în afară de alcool etilic și dioxid de carbon se formează în cantitate mai mare glicerol (până la 30% din zahărul fermentat).

Mustul de struguri are un pH acid (≅ 3,6) de aceea la fabricarea vinurilor drojdiile sunt avantajate și au cele mai bune condiții de dezvoltare și activitate metabolică.

Substanțele chimice existente sau adăugate mediului pot influența procesul fermentativ.

Fosfații au o influență pozitivă deoarece participă la formarea acizilor adenilici, contribuie la formarea esterilor fosforici ai glucidelor, forme în care acestea sunt transportate în celulă și fermentate.

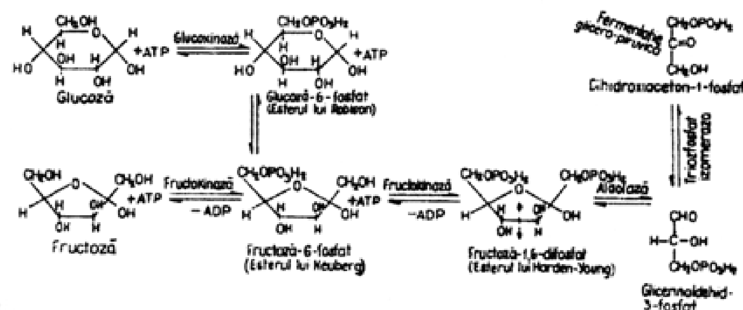
Dioxidul de sulf se adaugă în cantități de 200-500 mg/dm^3 pentru a permite activitatea drojdiilor fermentative care, spre deosebire de alte drojdii, sunt sulfitorezistente. În concentrații admise de tehnologie, SO_2 influențează viteza de fermentare, favorizând activitatea drojdiilor tipice. Dacă doza de SO_2 introdusă este accidental mai mare, fermentarea alcoolică este deviată de la forma de bază deoarece dioxidul de sulf se combină cu aldehida acetică, ceea ce conduce la formarea în exces a glicerolului, a acidului acetic și a unor cantități mici de alcool etilic.

Temperatura. Enzimele componente ale sistemul zimazic prezintă fiecare un optim de activitate, iar proprietățile sunt determinate genetic de caracterele de specie. Fermentarea alcoolică poate avea loc între 0-35°C. În funcție de specia de drojdie predominantă sau folosită în cultură pură temperaturile optime sunt la:

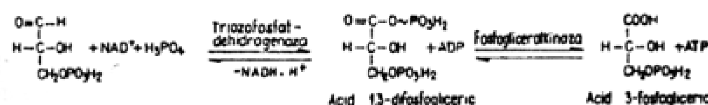
28-30°C, pentru drojdia de spirt și de panificație (*Saccharomyces cerevisiae)*
6-12°C, pentru drojdia de bere (*Saccharomyces carlbergensis*)
15-20°C, pentru drojdiile de vin (*Saccharomyces cerevisiae var ellipsoideus și oviformis*), care produc o fermentare mai lentă la aceste temperaturi, dar conduc la obținerea unui vin de calitate deoarece la temperaturi mai scăzute se evită pierderile de substanțe volatile.

Biochimismul formării produșilor principali și secundari în fermentația alcoolică propriu-zisă

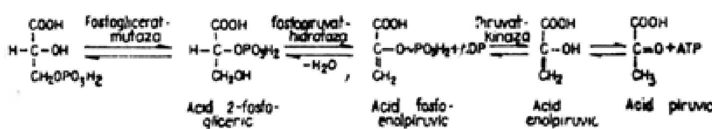
Etapa I-Fosforilarea hexozelor și degradarea lor în câte două molecule de trioze



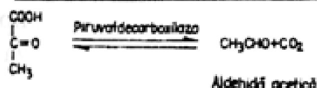
Etapa a II-a Oxidarea prin dehidrogenare a glicerinaldehidei-3-fosfat



Etapa a III-a-Transformarea acidului 3-fosfogliceric în acid piruvic



Etapa a IV-a- Decarboxilarea acidului piruvic



Etapa a V-a-Reducerea acetaldehidei în alcool etilic



Fig. 39. Biochimismul fermentației alcoolice (Cotea V., 1985)

Conversia prin fermentare în mediu acid a glucidelor, catalizată de enzim din drojdii se desfășoară în cinci etape principale:

- Transformarea diferitelor tipuri de glucide în esteri ai glucozei ș formarea esterului fructo-furanozo-1,6-difosfat. Este etapa în care se consum energie prin transformarea ATP-ului în ADP.
- Formarea triozelor - aldehidă fosfoglicerică și fosfodioxiacetonă.
- Transformarea triozelor până la formarea de acid piruvic. Energ eliberată prin procesul de oxido-reducere este înmagazinată prin fosforilar de substrat.
- Decarboxilarea acidului piruvic și formarea de aldehidă acetică.
- Aldehida acetică se reduce devenind acceptor de hidrogen si se formea alcoolul etilic.

Reacția globală a fermentației alcoolice în mediu acid:

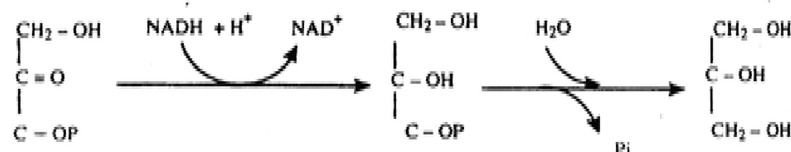


$$C_6H_{12}O_6 \xrightarrow{2\ ADP\ +\ 2Pa} 2C_2H_5OH + 2\ CO_2 + 2\ ATP\ (117\ Kj/mol)$$

Formarea produșilor secundari

În fermentația alcoolică rezultă o diversitate de produse secundare. Î vinuri au fost identificate prin cromatografie 300-500 de substanțe diferit Majoritatea lor rezultă prin fermentare, iar celelalte sunt dependente d compoziția mediului.

Glicerolul se acumulează în mod normal în cantități de 3,3 g/100 glucoză fermentată și are un rol benefic asupra calității vinului, conferindu "catifelaj"-ul. Glicerolul se formează din fosfodioxiacetonă în primele etap ale fermentării, când aldehida acetică se află în cantități mici.



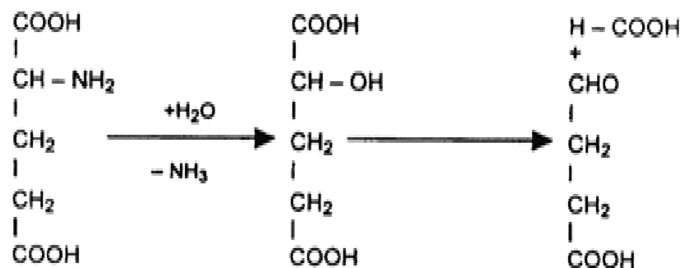
Aldehidele se acumulează în mediul de fermentare. Cea mai importan aldehida acetică, la concentrații ce depășesc 2,5 $mg.dm^{-3}$ influențează indire gustul, deoarece prin oxidări duce la formarea de acid acetic.

Acizii provin atât din must cât și din procesul fermentativ. Ei dau acidita vinului (acid acetic, formic, propionic, butilic) precum și o aciditate fixă (ac lactic, succinic) care se regăsește în aciditatea totală a vinului.

Acidul lactic se poate acumula în cantități de 20 mg/dm^3 provenind di acid piruvic care acceptă H.

Acidul acetic se acumulează în cantităţi de 80-120 $mg.dm^{-3}$. El poate avea rol în formarea esterilor (acetat de etil), iar la concentraţii mai mari determină modificări de gust, ceea ce conduce la deprecierea vinului.

Acidul succinic se formează fie din zahăr fie din aminoacizi şi poate reprezenta 0,7% din cantitatea de zahăr fermentat. Din acidul glutamic prin dezaminare hidrolitică se eliberează amoniacul ce poate fi folosit de drojdii ca sursă de azot şi rezultă acidul hidroxiglutaric din care se poate forma acidul formic şi aldehida succinică. Prin oxidare rezultă acidul succinic.



După F. Ehrlich acest tip de reacţie se aplică la toţi acizii a-aminaţi şi explică formarea de aldehide care prin reacţii de oxido-reducere de tip Cannizzaro produc alcooli şi acizi (Moţoc D, 1962)

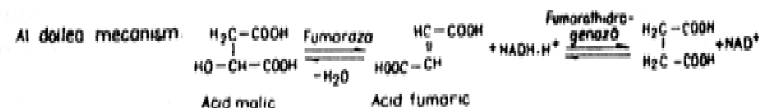
Există şi alte căi care explică acumularea acidului succinic în mediul de fermentaţie (Fig. 40)

Formarea acidului succinic

Primul mecanism



Al doilea mecanism



Al treilea mecanism

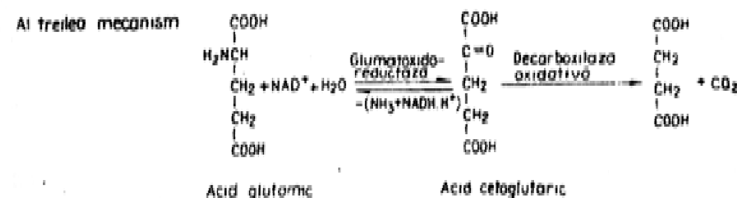
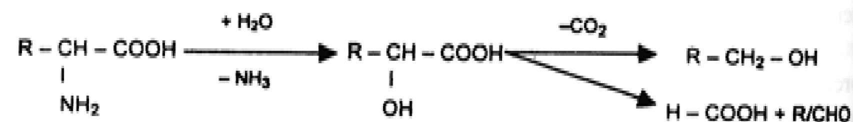


Fig. 40. Mecanismul de formare a acidului succinic

Alcoolii superiori rezultă atât din glucide, cât şi din aminoacizi, aceştia din urmă constituind sursa principală.



Dintre alcoolii superiori, care se acumulează mai ales la fabricarea spirtului, fac parte alcoolii amilic, izoamilic, propanol, butanol, care pot şi contribuie la formarea unor substanţe de aromă. Alcoolii superiori ce se obţin la fabricarea spirtului distilă la 130°C, obţinându-se o fracţiune de distilare bogată în alcooli superiori, denumită ulei de fuzel, folosit în industria vopselurilor.

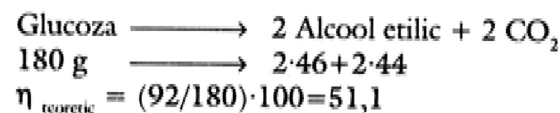
La fabricarea vinului cantitatea de alcooli superior de ... 250 $mg.dm^{-3}$ şi sunt precursori de aromă deoarece se pot combina cu diferiţi acizi rezultând esteri cu aromă caracteristică. În vinuri, din fenilalanină se formează alcoolul feniletilic care dă aromă de trandafir. Ţinând cont de diversitatea aminoacizilor, se poate explica varietatea alcoolilor şi esterilor formaţi.

Diacetilul şi acetoina se formează când cantitatea de celule de drojdie este foarte mare. Prezenţa în cantităţi mici a acestor substanţe nu influenţează calităţile senzoriale ale produsului. La concentraţii de 0,4 $mg.dm^{-3}$ se sesizează gustul de diacetil, iar la concentraţii mai mari apar modificări senzoriale nedorite. Gustul este sesizat mai ales în bere unde se formează şi sub acţiunea unor bacterii contaminante.

Mercaptanii apar când gruparea OH din alcooli este înlocuită cu gruparea SH. Prezenţa acestor substanţe cu gust neplăcut se datorează acţiunii unor drojdii cu calităţi nedorite.

Ca rezultat al formării produselor secundare, în industria fermentativă se obţin produse diversificate, apreciate prin calităţile senzoriale şi nutritive.

Bilanţul masic al fermentaţiei alcoolice



Glucoza $\longrightarrow$ 2 Alcool etilic + 2 CO_2

180 g $\longrightarrow$ $2 \cdot 46 + 2 \cdot 44$

$\eta_{teoretic} = (92/180) \cdot 100 = 51,1$

Randamentul practic este de $(0,64\text{-}0,67) \cdot \eta_{teoretic}$ deoarece nu toată cantitatea de zahăr este transformată în alcool. O parte din cantitatea de zahăr este transformată în produşi secundari, o altă parte este transformată în produşi de biosinteză intracelulari - componenti ai biomasei celulare, iar o altă cantitate este transformată prin respiraţie în produşi finali.

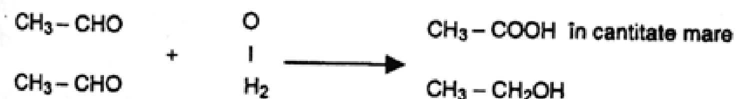
Bilanţul energetic al fermentaţiei alcoolice

Din punct de vedere energetic fermentarea alcoolică nu este avantajoasă pentru celula de drojdie, deoarece în anaerobioză prin fermentarea unui mol de glucoză celula consumă 2 moli de ATP în etapa de formare a esterilor fosforici, apoi înmagazinează energia eliberată în 4 moli de ATP, astfel încât câştigul net este de 2 moli ATP/mol glucoză fermentată. Energia potenţială a glucozei se regăseşte în proporţie de 92,5% în alcool etilic (alcoolul etilic are o mare putere energetică, de 1363 KJ/mol alcool), 2,5-3% energie înmagazinată în ATP, iar restul de energie se regăseşte în produse secundare sau se pierde prin căldură.

Fermentaţia în mediu alcalin

Este o fermentaţie deviată de la fermentarea propriu-zisă atunci când pH-ul mediului este alcalin. Acest lucru se obţine prin adăugare de Na_2CO_3 3% astfel încât din glucoză se formează alcooli etilic, glicerol, acid acetic şi dioxid de carbon.

Explicarea formării glicerolului în cantităţi mai mari este datorată reacţiilor de oxidoreducere ale aldehidei acetice în mediu alcalin (reacţie Canizzaro).

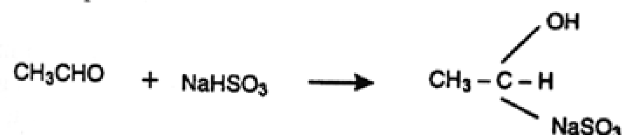


Deoarece aldehida este blocată astfel, dehidrogenaza redusă ($NADH+H^+$) este disponibilă şi reduce fosfodioxiacetona cu formarea de glicerol.

Cultura de *Zygosaccharomyces acidifaciens* folosită în primul război mondial la obţinerea glicerinei, la rândul ei utilizată în producerea de nitroglicerină, poate produce prin fermentarea glucidelor în mediu alcalin, aprox. 30 g glicerol.dm^{-3}.

Fermentaţia sulfitică

Este fermentaţia în care aldehida acetică formează în prezenţa sulfitului de sodiu un compus sulfitic:



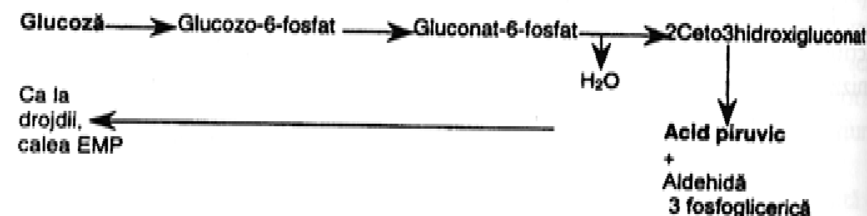
iar dehidrogenaza în forma redusă favorizează formarea de glicerol. Aceas fermentaţie poate avea loc la păstrarea marcurilor de fructe în prezenţa SO Atunci când apar fermentaţii deviate glicerolul format poate să fie transform în **acroleină** care dă un gust amar pregnant şi care este greu de îndepărtat procesarea fructelor conservate cu SO_2.

În afară de aspectele pozitive ale fermentaţiei alcoolice la fabricare spirtului, vinului, distilatelor, berii, pâinii poate prezenta şi aspecte negati atunci când se produce fermentarea spontană a unor produse bogate în zah (siropuri, dulceţuri, compot, miere). În acest caz fermentarea este dată d drojdii osmotolerante care produc prin fermentare alcool etilic, CO_2 şi cantitate apreciabilă de acid acetic, ceea ce duce la deprecierea lor.

Fermentaţii alcoolice neconvenţionale, produse de bacterii

Există bacterii care pot produce cantităţi apreciabile de alcool: *Bacill macerans, Leuconostoc, Clostridium acetono-etillicus* iar *Zymomonas mobilis* *Zymomonas anaerobica*, produc prin fermentare 10° alcool. Cu aceste bacter pot fi fermentate derivatele celulozice, pentru obţinerea de alcool carburant.

Zymomonas mobilis formează alcoolul etilic pe calea Entner - Doudoro producând prin fermentarea glucozei, alcool etilic şi dioxid de carbon con form schemei:



Cu ajutorul bacteriilor se obţine alcool cu întrebuinţări indutriale, care nu este folosit în alimentaţie deoarece bacteriile nu produc şi substanţe secundare de aromă, iar randamentul de conversie este mai mic decât al drojdiilor.

8.4. FERMENTAŢIA LACTICĂ

Fermentaţia lactică este un proces anaerob prin care glucidele fermentescibile sunt metabolizate sub acţiunea echipamentului enzimatic al microorganismelor în acid lactic ca produs principal şi ca produse secundare: diacetil, acetoină, acid acetic, alcool etilic şi CO_2.

Calea metabolică de producere a acidului lactic este frecvent întâlnită în lumea microbiană, în schimb randamente superioare de conversie a glucidelor în acid lactic sunt întâlnite la bacterii şi mucegaiuri. Dintre acestea, bacteriile

lactice, considerate agenți tipici ai fermentației sunt folosite industrial în biotehnologii alimentare, la industrializarea laptelui și a cărnii, în panificație, la conservarea produselor vegetale și la obținerea acidului lactic. Mucegaiuri selecționate ale genurilor: *Aspergillus, Penicilium și Mucor* pot fi cultivate submers cu aerare dirijată, pentru obținerea industrială a acidului lactic. În condiții naturale acidului lactic se poate forma și în țesutul muscular prin procesul de glicoliză, prin secvențe biochimice catalizate de enzime similare cu cele ale celulei microbiene.

Caractere morfo-fiziologice generale ale bacteriilor lactice

Bacteriile lactice sunt foarte răspândite în natură în diferite biotopuri: aparatul foliar al plantelor, în microbiota intestinală (în primii ani de viață sau când în alimentație predomină laptele), în cavitatea bucală, în microbiota pielii. Dintre sursele alimentare permanent asociate cu bacteriile lactice amintim laptele (în care bacteriile lactice prezente pe canalele galactofore sunt antrenate la mulgere) și legumele (varza, castraveți ș.a.)

Caractere morfologice

Bacteriile lactice prezintă heterogenitate morfologică: principalele forme sunt derivate de la forma coccus, și se pot prezenta sub formă de streptococi (g. *Lactococcus* și g. *Streptococus*), de diplococi (g. *Leuconostoc*), de tetrade (g. *Pediococus*); numeroase alte bacterii lactice se prezintă sub formă cilindrică, de bastonașe cu dimensiuni variabile, izolate sau în lanțuri lungi, incluse în genul Lactobacillus *(Lactobacterium)*.

Caractere fiziologice

Bacteriile lactice sunt pretențioase din punct de vedere nutritiv și înmulțirrea lor are loc în medii cu compoziție chimică complexă. Ca surse de carbon și energie, bacteriile lactice pot să producă asimilarea sau fermentarea pentozelor: riboză, xiloză, arabinoză, a hexozelor: glucoză, galactoză, a diglucidelor: lactoză, maltoză, zaharoză. Dintre acizi, acidul malic poate fi transformat în acid lactic, iar acidul citric în acetoină și diacetil. Acidul lactic nu poate fi folosit de către bacteriile producătoare și acumularea sa prin fermentare conduce la inhibarea înmulțirii și încetinirea vitezei de fermentație. Ca surse de azot, bacteriile lactice preferă aminoacizi, peptide și amide, fără să poată folosi sărurile amoniacale. Bacteriile lactice au enzime proteolitice intracelulare care pot avea un rol pozitiv la maturarea brânzeturilor, după eliberarea lor din celulele autolizate. Specia *Lactobacillus* casei poate produce o hidroliză enzimatică a cazeinei.

Bacteriile lactice în general, din care cele termofile în special, necesită prezența în mediu a unor factori de creștere, vitaminele: B_2, B_6, biotina, acidul para-aminobenzoic, acidul folic, acidul pantotenic.

Bacteriile lactice sunt acidotolerante: valorile minime de pH la care au loc creșterea sunt de 4,3-4,8 pentru lactococi și 3,8-4,4 pentru lactobacili cu valori optime în domeniul de pH=4-6.

În raport cu oxigenul din aer, bacteriile lactice sunt anaerobe sau facultativ anaerobe. Prin creștere în medii lichide (bere, vin, sucuri) dau o tulburare persistentă și acrire, iar prin dezvoltarea în lapte produc coagularea acidă a cazeinei, când pH-ul se reduce la 4,6 ca rezultat al formării de acid lactic.

Bacteriile lactice sunt adaptate să crească într-un domeniu larg de temperaturi (0-55°C) cu valori optime în domeniu mezofil (20-25°C - streptobacterii, 30-35°C - lactococii) sau termofil (35-45°C - lactobacterii). Sunt bacterii nesporulate și pot fi inactivate pe cale termică la temperaturi mai mari de 65°C (în 30 de minute) sau la 72-74°C în 15-20 de secunde (regim de pasteurizare a laptelui).

Caractere taxonomice și clasificarea bacteriilor lactice

După punerea în evidență a bacteriilor lactice ca agenți de acrire a berii de către Louis Pasteur în 1875, mulți cercetători au studiat aceste bacterii atât de răspândite în natură. O clasificare de referință aparține lui **Orla Jensen** (1919), care împarte bacteriile lactice în două mari grupe:

1. Bacterii lactice adevărate, care produc numai acid lactic cu un randament de 90-100% din zahărul consumat, bacterii Gram - pozitive, facultativ anaerobe.

Dintre genurile mai importante g. *Thermobacterium* și g. *Streptobacterium* în care erau incluși lactobacilii, g. *Streptococcus* (streptococi lactici) precum și genuri ca: β-*coccus* (actual g. *Leuconostoc*) și g. *Tetracoccus* (g. *Pediococcus)*).

2. Pseudofermenți lactici (bacterii lactice atipice) care produc prin fermentație cantități mici de acid lactic și în cantități superioare, gaze: CO_2, H_2, acid acetic ș.a., bacterii Gram negative, aerobe. În această grupă erau incluse bacteriile coliforme cu g. *Escherichiae* și g. *Aerogenes* (actual g. *Enterobacter*).

O nouă **clasificare, a lui Bergey**, separă bacteriile lactice adevărate în familia **Lactobacteriaceae** în timp ce bacteriile coliforme se regăsesc în familia **Enterobacteriaceae**.

Cea mai recentă clasificare aparține lui **Kandler și Weiss** (1986) care în afară de proprietățile fiziologice și tinctoriale ale bacteriilor lactice are la bază cunoașterea procentuală a conținutului în baze azotate: guanină și citozină din structura acizilor nucleici, criteriu taxonomic stabil pe baza căruia s-au putut stabili similitudini sau diferențieri între speciile cunoscute.

Conform acestei clasificări bacteriile lactice sunt incluse în familia LACTOBACTERIACEAE cu următoarele genuri:

1. Genul Streptococus

*1.1. **Grupul streptococilor lactici*** incluşi în **genul Lactococcus** cu speciile: *Lactococcus lactis; Lactococcus lactis biovar diacetilactis; Lactococcus lactis biovar acetoinicus şi Lactococcus cremoris* (syn. Str. cremoris - streptococul smântânii).

*1.2. **Grupul viridans***, bacterii ce aparţin **genul Streptococcus** cu specii importante: *Streptococcus salivarius subsp. thermophillus (SST)* (syn. Streptococcus thermophillus) cultură folosită la fabricarea iaurtului şi *Str. bovis.*

*1.3. **Grupul streptococilor fecali,*** denumiţi şi **enterococi**, cu specia reprezentativă *Str. fecalis.*

*1.4. **Grupul streptococilor patogeni***, cu speciile *Str. pyoneges* (agentul scarlatinei) şi *Str. agalactiae* (agentul mastitei, transmisibil prin lapte colectat de la vaci bolnave).

2. Genul Lactobacillus (syn. Lactobacterium), include aproximativ 50 de specii clasificate în funcţie de tmeperatura optimă de activitate şi modul de fermentare a glucidelor în **homofermentativi** - lactobacili care produc numai acid lactic şi cantităţi minore de substanţe de aromă şi în **heterofermentativi** - lactobacili producători de acid lactic, acid acetic, diacetil, CO_2.

2.1. Lactobacili homofermentativi

a) Termofili (T_0=40-50°C)

Lactobacillus delbruecky, subspecia delbruecki

Lactobacillus delbruecki, subspecia lactis

Lactobacillus delbruecki, subspecia bulgaricus (syn. Lactobacterium bulgaricum, LDB - cultură pentru prepararea iaurtului).

b) Mezofili (T_0=30-35°C)

Lactobacillus acidophillus

Lactobacillus helveticus

2.2. Lactobacili facultativ heterofermentativi nezofili

Lactobacillus plantarum

Lactobacillus casei

Lactobacillus sake

2.3. Lactobacili heterofermentativi, mezofili

Lactobacillus brevis

Lactobacillus viridiscens, Lb. fermenti

Lb. iulinus (syn. Sporolactobacillus inulinus, fermentează inulina)

Lb. bifidum (syn. g. Bifidobacterium bifidus)

3. Genul Leuconostoc - include bacterii sub formă de coci, diplococi, heterofermentativi - produc prin fermentaţie acid lactic, alcool etilic, CO_2, iar prin biosinteză, poliglucidele de tip dextran; sunt mezofile. Dintre speciile cu importanţă practică: *Leuconostoc mesenteroides sbsp cremoris; Leu. citrovorum şi Leu. paracitovorum* - bacterii care pot folosi ca sursă de carbon - citraţii;

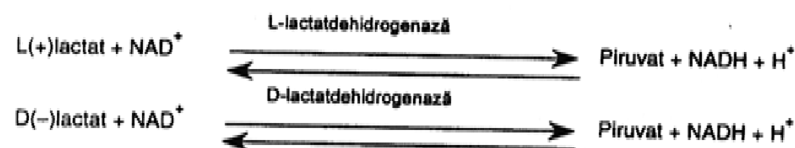
Leu. mesenteroides şi Leu. dextranicum - sunt producătoare de dextran prin conversia zaharozei şi polimerizarea dextrozei.

4. Genul Pediococcus - include bacterii lactice homofermentative, mezofile, cu temperatura optimă la 30°C, cu speciile: *Pediococcus acidi lactici, Pediococcus cerevisiae.*

Căi de formare a produşilor principali şi secundari în fermentaţia lactică

În funcţie de echipamentul enzimatic al bacteriilor lactice şi sursele de carbon fermentescibile diferă biochimismul formării produşilor de fermentaţie.

*1. **Bacteriile lactice homofermentative*** produc fermentarea anaerobă a hexozelor pe calea Embden - Mayerhof - Parnas (EMP) până la formarea acidului piruvic, apoi fiind lipsite de enzima piruvat decarboxilază, acidul piruvic devine acceptor de hidrogen



În fermentaţia homolactică, forma predominantă a acidului lactic este dependentă de stereospecificitatea lactatdehidrogenazei (lactococii formează L(+) - lactat şi lactobacilii D(-) lactat), dar şi de prezenţa lactat racemazei, care atunci când este activă în celula microbiană, rezultă prin fermentaţie, amestecul racemic (D, L-lactat), catalizând reacţia:



Ecuaţia globală a fermentaţiei homolactice:



$$C_6H_{12}O_6 + 2\ ADP + 2P_i \rightarrow 2\ CH_3\text{-CHOH-COOH} + 2\ ATP + 75\ kJ$$

Pentru a fi fermentate, glucoza, galactoza şi lactoza pot fi transportate ca atare în celulă printr-un sistem activ de permeaze prezent la *Streptococcus salivarius subspecia thermophillus* şi lactobacili termofili sau prin transport activ catalizat de sistemul fosfotransferază - fosfoenolpiruvat (PT-PEP) prezent la bacterii ale genului **Lactococcus** şi **Lactobacillus sp.**, cu formarea esterilor fosforici.

Lactoza sau lactozo-P în celula bacteriană sub acţiunea β-galactozidazei (lactazei) este transformată în glucidele componente.



În timp ce glucoza este metabolizată direct pe calea EMP, galactoza este transformată pe următoarele căi metabolice:

a) **Calea D-tagatozei 6P (g. Leuconostoc)** (Fig. 41)

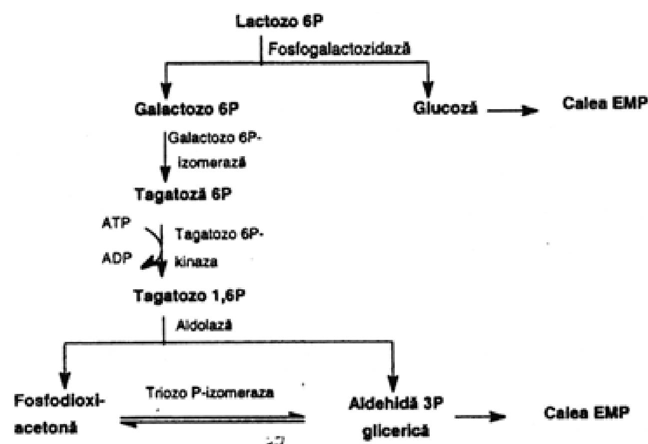


Fig. 41. Calea D-tagatozei 6P

b. **Calea Leloir (SST, LDB, Leuconostoc)** (Fig. 42)

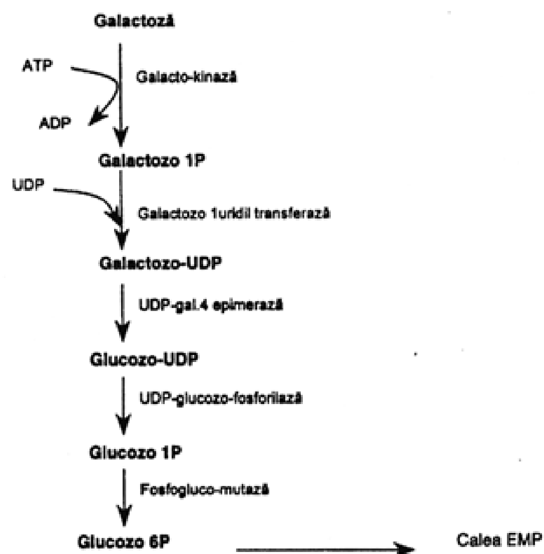


Fig. 42. Calea Leloir de metabolizare a galactozei

Calea glicolitică (Embden Mayerhof Parnas) de fermentaţie a glucozei şi a produşilor intermediari rezultaţi din galactoză/lactoză, se prezintă simplificat astfel:

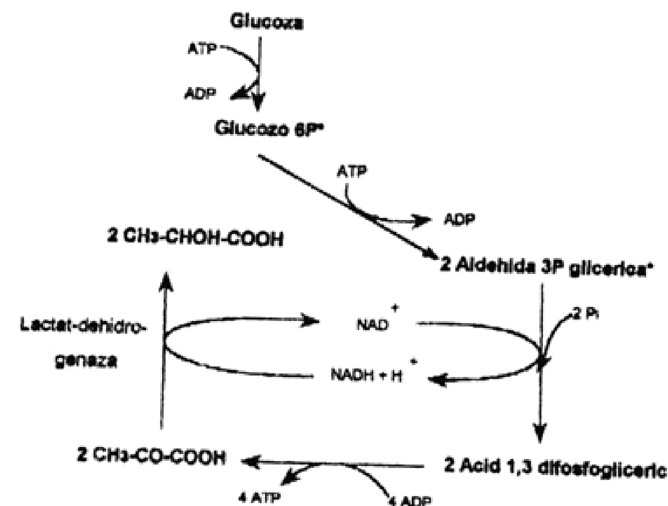


Fig. 43. Fermentaţia lactică produsă de bacterii homofermentative

În fermentaţia homolactică se pot forma în cantităţi mici substanţe de aromă, diacetil şi acetoină, fie prin metabolizarea glucidelor (a) (g. *Lactoccus*), fie a citraţilor (b), care asigură o sursă suplimentară de acid piruvic, după următorul biochimism:

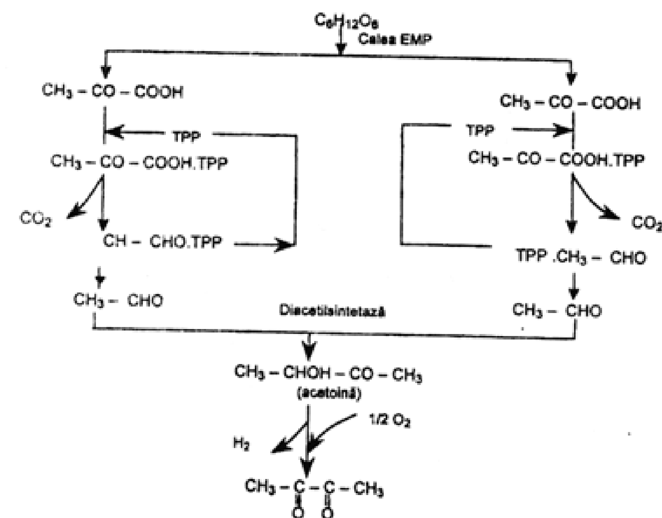


Fig. 44. Formarea diacetilului din glucide

b) Lactococcii aromatizanți *(L. lactis-diacetylactis, L. lactis cremoris)* produc în lapte cantități de 0,1-1,3 mg % diacetil care pot fi mărite prin adaos de citrat, controlul acidității și al gradului de aerare.

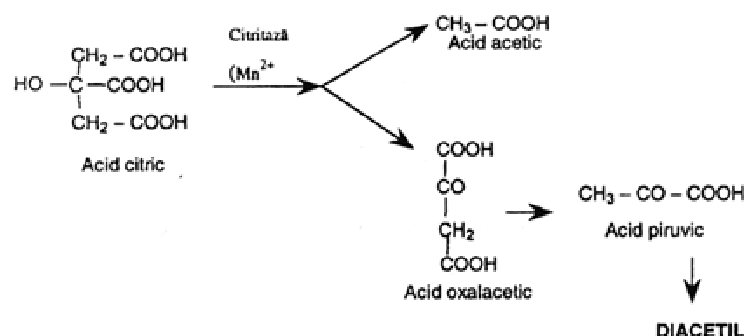


Fig. 43. Formarea diacetilului din citrați

Lactobacillus delbruecki subspecia bulgaricus poate forma **aldehidă acetică** din surse similare cu rol în formarea aromei specifice a iaurtului, optim, atunci când raportul intre aldehida acetică și diacetil este de 2,8.

*2. **Bacteriile lactice heterofermentative*** produc fermentația anaerobă a glucidelor (pentoze, hexoze) pe calea pentozo-fosfatului) (6P-gluconatului)

În funcție de specie diferă și natura produselor de fermentație. Astfel *Lactobacillus brevis* produce prin fermentație heterolactică: acid lactic, acid acetic și CO_2 în timp ce *Leuconostoc mesenteroides* - acid lactic, etanol și CO_2.

Fermentația heterolactică se poate produce și pe calea fructozo- 6P, fă formare de CO_2 sub acțiunea lui *Lactobacillus bifidus*, după ecuația generală



$$2\,C_6H_{12}O_6 + 5\,ADP + 5\,P \rightarrow 1\,CH_3\text{-}CHOH\text{-}COOH + 3\,CH_3\text{-}COOH + 5\,AT$$

Bifidobacteriile care reprezintă 95% din microbiota intestinală a sugaril pot fi folosite pentru obținerea unor produse lactate cu efect terapeutic.

Aspecte practice ale fermentației lactice

Fermentația lactică dirijată este folosită în industrializarea laptelui cân se folosesc culturi pure selecționate de bacterii lactice la obținerea produsel lactate acide (lapte acru, sana, chefir, lapte acidofil, iaurt, smântână fermentată a untului și la fabricarea brânzeturilor.

Pentru conservarea prin murare a produselor vegetale sunt create condi pentru activitatea fermentativă a bacteriilor lactice din microbiota epifită plantelor, cu formarea de acid lactic ș.a., la murarea verzei, tomatelc

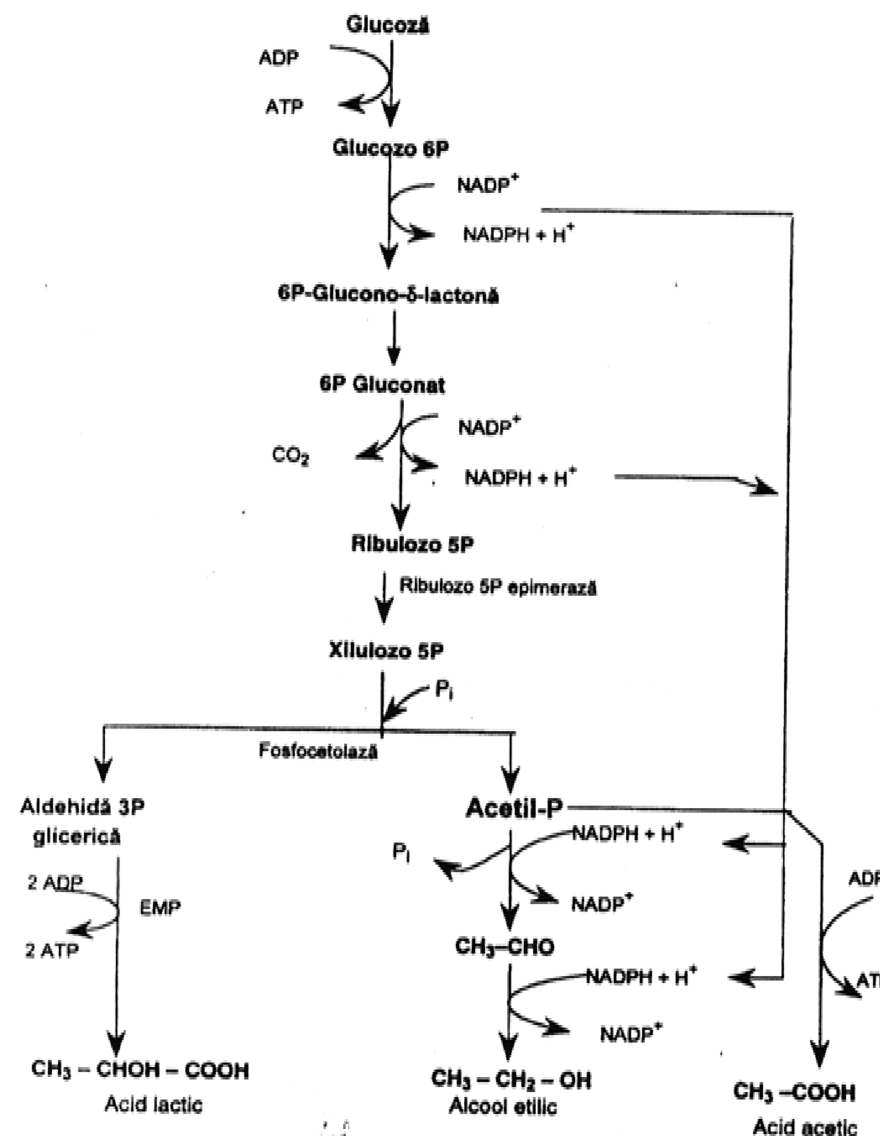


Fig. 46. Biochimismul fermentației heterolactice

castraveților, măslinelor și însilozarea furajezelor verzi. Fermentația lactică intervine spontan la fermentarea boabelor de cacao și cafea cu rol pozitiv î obținerea unor produse de calitate. În industria panificației activitate fermentativă a bacteriilor lactice din microbiota făinii sau a culturil selecționate contribuie alături de cea a drojdiei de panificație la formarea arom și la creșterea în volum a pâinii.

Activitatea excesivă a bacteriilor lactice, poate conduce la deprecier calității și la alterarea unor produse (acrirea berii, borșirea vinului) sau pierde de zaharoză la difuzie, în industria zahărului.

8.5. FERMENTAȚIA PROPIONICĂ

Fermentația propionică este un proces anaerob prin care substrat fermentescibil, acidul lactic, sub acțiunea complexului de enzime ale bacteriil propionice - agenții tipici - este transformat în: acid propionic, acid acetic și CO

În afara bacteriilor propionice (g. *Propionibacterium*), formarea prin c tabolism a acidului propionic este întâlnit la bacterii anaerobe ale g. *Clostridiu (Cl. propionicum)* și g. *Veillonella*.

Bacteriile propionice descoperite în 1906 de E.V. Freudenreich și (Jensen sunt răspândite în natură în: tractul digestiv al animalelor, în lapte brânzeturi din care pot fi izolate.

Caractere morfofiziologice ale bacteriilor propionice

Bacteriile propionice se prezintă sub formă de bastonașe subțiri și scurt cu capetele rotunjite și dimensiuni (2-4)x(0,5)μm. în condiții nefavorabile produce o aplatizare a terminațiilor celulei având o formă similară cu cea corynebacteriilor.

Sunt bacterii imobile, Gram pozitive, anaerobe. În aerobioză cresc greu și prezintă forme alungite, ramificate V, Y sau chinezisme. Pe mediu de bulion, carne, agar formează colonii lenticulare de culoare albă, crem, galben, roșu. Își pot obține energia necesară proceselor vitale pe cale fermentativă, anaerob, dar pot fi microaerotolerante deoarece au în catena respiratorie catalază și citocromi.

Ca sursă de carbon și energie bacteriile propionice preferă lactații cu acid lactic L+, citrații, malatul, glicerolul, glucide (lactoză, maltoză, glucoză, galactoză). Ca surse de azot pot folosi: peptone, peptide, aminoacizi esențiali pentru creștere. Necesită prezența unor factori de creștere, dintre care biotina și acidul pantotenic sunt esențiali pentru producerea vitaminei B_{12}.

Din punct de vedere al nutriției minerale necesită în primul rând magneziu, apoi alte elemente minore: Na, P, K, Mn, Cl, Ca, S, Fe. Prezența

clorurii de sodiu în concentrații mai mari de 3% încetinește viteza de creștere a bacteriilor propionice; creșterea fiind posibilă până la max. 6,5%.

Sunt bacterii mezofile, cu temperatură optimă la 30°C și temperatu 2,8-7,2°C. Prin pasteurizarea laptelui, bacteriile propionice prezente în mod natural în lapte, sunt inactivate.

Se dezvoltă optim în medii cu pH 6,5-7, creșterea fiind oprită la pH=5

Clasificarea bacteriilor propionice

Bacteriile propionice - agenți tipici ai fermentației propionice, sunt cuprinse în genul *Propionibacterium*, familia *Lactobacteriaceae*, cu următoarele specii (tabelul 22)

Tabel 22. Bacterii propionice

Specii/subspecii	Denumiri anterioare
1. Propionibacterium freundereichi - freundereichi - globosum - shermanii	P. freundereichi P. globosum P. shermanii P. casei
2. Propionibacterium thoenii	P. rubrum
3. Propionibacterium acidipropionici	P. arabinosum P. pentosaceum
4. Propionibacterium jensenii	P. raffinosaceum P. petersonii P. technicum P. zeae

După Buchanan, H. Gibbons, 1974, bacteriile propionice fac parte din familia *Propionibacteriaceae*, ordinul *Actinomycetales*.

Biochimismul fermentației propionice

În fermentația propionică, substratul fermentescibil acidul lactic este metabolizat anaerob conform reacției generale:



$$3\ CH_3\text{-}CHOH\text{-}COOH \rightarrow 2\ CH_3\text{-}CH_2\text{-}COOH + CH_3\text{-}COOH + CO_2 + H_2O\ (+3\ ATP)$$

Formarea acidului propionic are loc pe calea **metil-malonil-coenzimei A transcarboxilazei**.

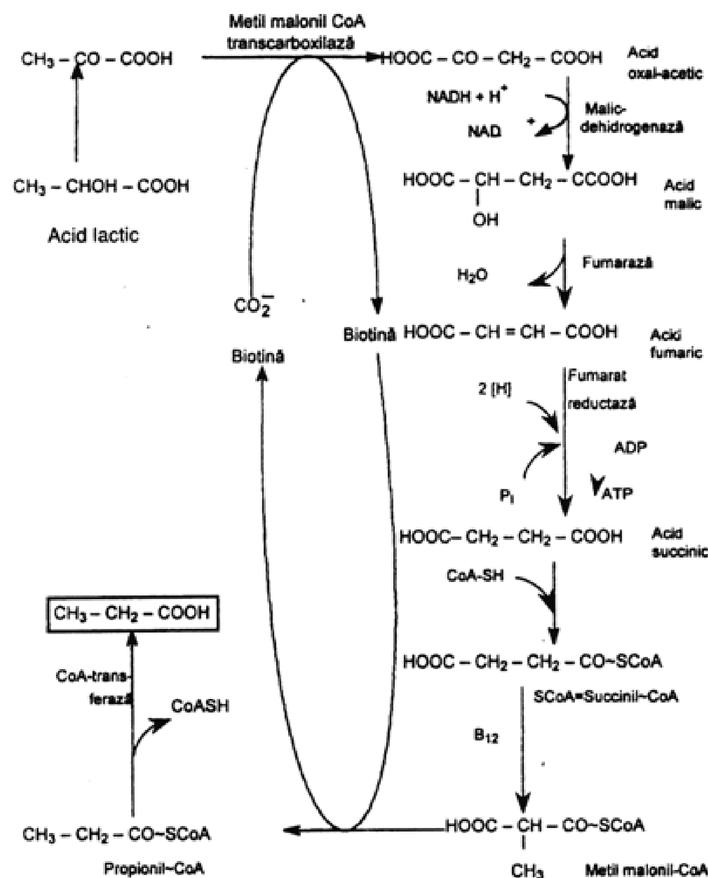


Fig. 47 Biochimismul fermentației propionice

În urma fermentației propionice raportul propionat/acetat variază între 1:1 la 1:5, iar cel al CO_2/acetat între 0,9-6,1 în funcție de specie și condițiile de mediu.

Aspecte practice ale fermentației propionice

Fermentația propionică dirijată este folosită la fabricarea brânzeturilor (Schweitzer, Ementhal), cu rol pozitiv în formarea ochiurilor, alveole rezultate prin difuzia lentă a CO_2, rezultat din fermentație sau prin decarboxilarea aminoacizilor, în formarea gustului specific și creșterea valorii alimentare, ca urmare a formării de către bacteriile propionice a vitaminei B_{12}.

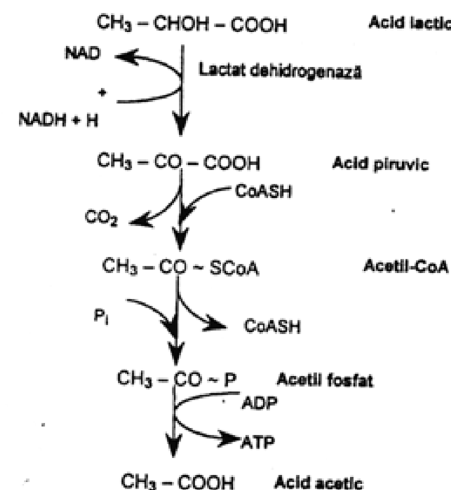


Fig. 48. Formarea produșilor secundari în fermentația propionică

În industria panificației, fermentația propionică produsă de bacterii propionice adaptate la mediul aluat, conduce la formarea suplimentară a CO_2 cu rol în creșterea volumului și a acidului propionic cu efect fungistatic ce previne mucegăirea pâinii la păstrare.

În condiții naturale bacteriile strict anaerobe producătoare de acid propionic, în urma transformării compușilor organici macromoleculari, au un rol ecologic în circuitul natural al carbonului și în formarea rezervelor de biogaz (CH_4+CO_2)

8.6. FERMENTAȚIA BUTIRICĂ

Fermentația butirică reprezintă un proces anaerob prin care diversele surse de carbon sunt metabolizate sub acțiunea bacteriilor butirice în produși principali ai fermentației: acid butiric și gaze: CO_2+H_2. În funcție de specie și condiții de fermentare se mai pot forma pe căi deviate de la fermentația butirică propriu zisă diverși solvenți: butanol, propanol, etanol, acetonă.

Caractere morfofiziologice și taxonomice ale bacteriilor butirice

Bacteriile butirice sunt răspândite în sol prin materii de dejecție, unde rezistă mult timp. Se prezintă sub forma de bastonașe drepte, singulare, mo-

bile, cu capacitatea de a produce un endospor cu dimensiunea mai mare decât a celulei vegetative, ceea ce duce la deformarea celulei (suveică, măciucă).

Sunt bacterii Gram pozitive și cresc numai în condiții anaerobe fiind lipsite de catalază și citocromi. Unele specii ale genului pot fi aerotolerante (ex. *Cl. acetobutylicum*)

Pentru creștere necesită temperaturi în domeniu mezofil sau termofil. În timp ce formele vegetative sunt inactivate la temperaturi de pasteurizare, endosporii sunt termorezistenți și pentru distrugere sunt necesare regimuri de sterilizare (121°C/4-10 minute, în mediu cu vapori de apă). În raport cu pH-ul, clostridiile necesită un pH apropiat de neutru, și creșterea este oprită la valori de pH=4,0-4,5.

Din punct de vedere fiziologic speciile genului *Clostridium*, **familia Bacillaceae**, se diferențiază prin diversitatea substraturilor folosite pe cale fermentativă și a produșilor de catabolism în următoarele grupe (tabelul 23).

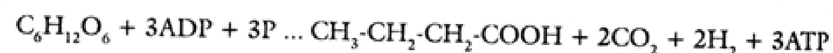
Tabel 23. Caractere fiziologice ale bacteriilor din g. *Clostridium*

Grupe/specii	Substraturi	Produs rezultat prin fermentație, particularități
1. Bacterii butirice		
C. butyricum	Glucoză, amidon, dextrine	Butirat
C.tyrobutyricum	Glucoză/lactat, glicerol, acetat	Acetat
C. pasteurianum	Glucoză, amidon, glicogen, dextrine	CO_2
2. Bacterii producătoare de solvenți		
C. butylicum	Glucoză	Butirat, acetat, butanol, 2-propanol, CO_2, H_2
C. acetobutylicum	Glucoză, glicerol, piruvat	Butirat, acetat, butanol, acetonă, etanol, CO_2, H_2.
3. Bacterii peptonolitice *C. histoliticum* *C. sporogenes* *C. sticklandi*	Proteine Aminoacizi	Acetat, lactat, NH_3, H_2
4. Bacterii producătoare de acid propionic *C. propionicum*	Alanină, Treonină	Acetat, Propionat, CO_2
5. Bacterii producătoare de acid acetic *C. aceticum*	CO_2+H_2 Fructoza	Acetat

Unele specii ale genului sunt patogene/toxicogene ca de exemp *Clostridium botulinum, Clostridium perfringens* și *Clostridium tetanomorphu*

Clostridium botulinum produce 7 neurotoxine imunologic diferenția cu acțiune paralizantă. Tulpini ale speciei pot fi individualizate în 4 grupe p baza caracterelor lor biochimice (proteolitice, lipolitice, glucidolitic sensibilitatea la oxigen și la bacteriofagi. Ingestia alimentelor ce conțin toxi preformate produce intoxicații tipice. Dacă are loc ingerarea atât a toxi preformate, a bacteriilor inclusiv a endosporilor, acestea înving bariera gastric se localizează în intestin unde produc toxinele lor și ca efect se produ toxiinfecția botulinică.

Biochimismul fermentației butirice are loc după ecuația generală:



$$C_6H_{12}O_6 + 3ADP + 3P \ldots CH_3\text{-}CH_2\text{-}CH_2\text{-}COOH + 2CO_2 + 2H_2 + 3ATP$$

Etapele procesului sunt prezentate în detaliu figura 49.

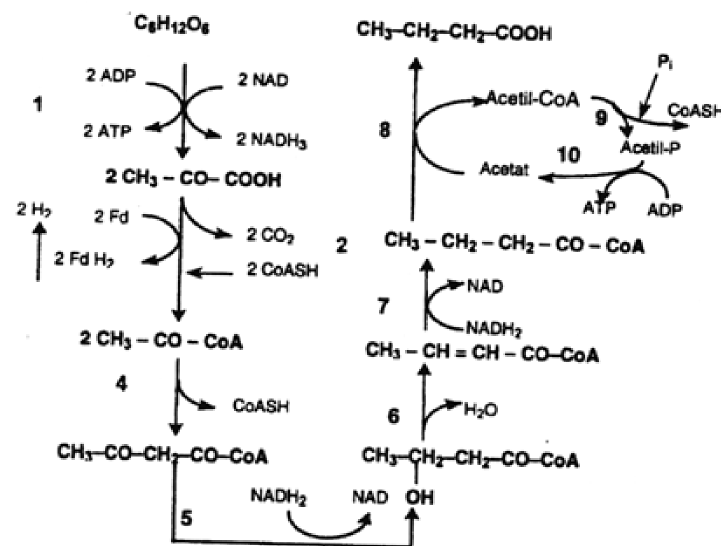


Fig. 49. Biochimismul fermentației butirice

Aspecte practice ale fermentației butirice

Fermentația butirică se poate folosi industrial la **fabricarea acidului butiric**. În acest scop se folosesc plămezi amidonoase zaharificate cu enzime din malț, se face inocularea cu **Clostridium butyricum** și fermentarea are loc

anaerob, la 35-40°C timp de 8-10 zile, în prezență de carbonat de calciu. Pentru obținerea acidului butiric, în plămada fermentată se adaugă sulfat de sodiu. Butiratul de sodiu se separă de sulfatul de calciu prin filtrare și după concentrare, în prezență de acid sulfuric se eliberează acidul butiric.

Acidul butiric sub formă esterificată este folosit la fabricarea unor esențe, deoarece butiratul de metil are aromă de măr, iar butiratul de etil, aromă de pară sau ananas, esențe folosite la obținerea produselor zaharoase. Fermentația butirică, atunci când are loc la fabricarea sau conservarea produselor alimentare, influențează negativ calitatea acestora. Astfel, la fabricarea brânzeturilor, când laptele este contaminat cu bacterii butirice, rezistente la pasteurizare, în timpul maturării odată cu formarea lactatului de calciu și creșterea pH-ului are loc germinarea sporilor și în urma activității lor se produce defectul de "balonare târzie" a brânzeturilor caracterizat prin deformare, rupturi în pastă și miros dezagreabil de acid butiric.

Fermentația butirică poate fi ocazional detectată la fabricarea spirtului din materii amidonoase, când acidul butiric rezultat are un efect inhibitor asupra drojdiilor, agenți ai fermentației alcoolice.

La obținerea băuturilor alcoolice, dacă la obținerea pe cale fermentativă a alcoolului s-a format și acid butiric, acesta ajunge în distilat căruia îi imprimă un gust neplăcut.

Dacă fermentația butirică spontană are loc în spații închise, gazele generate prin fermentație pot deveni explozive.

Bacterii ale genului *Clostridium* pot fi agenți de alterare a conservelor, caracterizată prin bombaj și pierderea valorii alimentare.

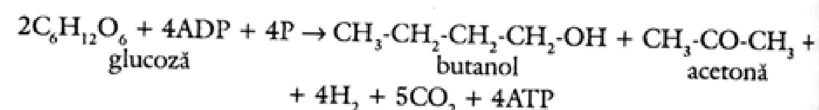
Reacțiile secvențiale sunt catalizate de următoarele enzime:

1 - Sistemul fosfotransferazic EMP
2 - Piruvat-ferodoxin-oxidoreductaza
3 - Hidrogenaza
4 - Acetil CoA transferaza (tiolaza)
5 - L(+) β-hidroxibutiril CoA-dehidrogenaza
6 - L3 hidroxiacil CoA-hidrolaza (crotonaza)
7 - Butiril - CoA - dehidrogenaza
8 - CoA - transferaza
9 - Fosfotransacetilaza
10 - Acetokinaza

Bacterii ale g. *clostridium* - producătoare de solvenți

Bacteriile genului *Clostridium* pot să producă fermentații derivate de la fermentația butirică cu acumularea în mediu a unor solvenți: acetonă, alcool etilic, butanol, propanol.

Clostridium aceto-butylicum produce solvenți după următoarea ecu generală:



$$2C_6H_{12}O_6 + 4ADP + 4P \rightarrow \underset{butanol}{CH_3\text{-}CH_2\text{-}CH_2\text{-}CH_2\text{-}OH} + \underset{acetonă}{CH_3\text{-}CO\text{-}CH_3} + 4H_2 + 5CO_2 + 4ATP$$

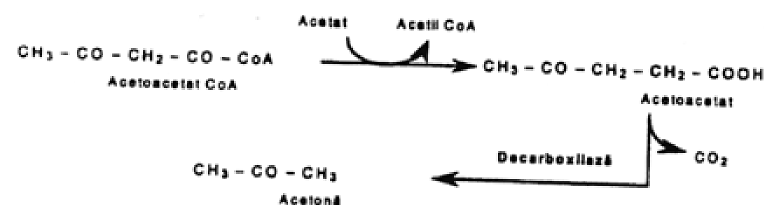
(glucoză)

În fermentațiile derivate produșii finali rezultă din catabolîții intermedi formați în fermentația butirică, astfel:

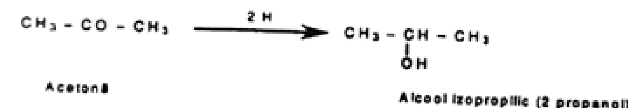
Formarea butanolului



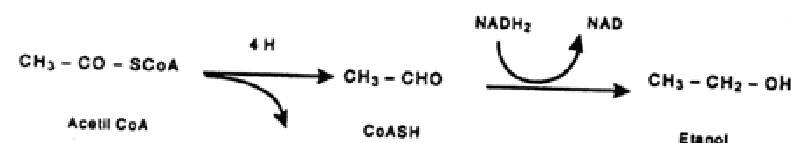
Formarea acetonei



Formarea propanolului (*Clostridium butylicum*)



Formarea alcoolului etilic (*Clostridium aceto-ethylicum*)



Fermentațiile derivate au aplicații practice în valorificarea unor cereale de calitate inferioară, tărâțe de ovăz ș.a. De exemplu din 1000 kg porumb se pot obține 163 kg butanol, 70 kg acetonă, 407 k CO_2, 11 kg H_2. Din 1000 kg tărâțe de ovăz se pot obține 72 kg alcool etilic și 39 kg acetonă, 14 kg acizi volatili. (Moțoc D., 1960)

Solvenții sunt utilizați la fabricarea lacurilor (butanol), în industria mătăsii artificiale (acetona) pentru sinteza alcoolului metilic (CO_2, H_2) ș.a.

8.7. PROCESE METABOLICE AEROBE (FERMENTAŢII OXIDATIVE)

Spre deosebire de fermentaţiile propriu-zise anaerobe, fermentaţiile: acetică, gluconică, citrică ş.a. sunt procese oxidative simple, care se desfăşoară în condiţii aerobe şi se diferenţiază de metabolismul oxidativ (respiraţie), prin aceea că oxidarea este limitata, rezultând în condiţii industriale acizi organici cu mare valoare economică.

FERMENTAŢIA ACETICĂ

Fermentaţia acetică este un proces metabolic aerob prin care substratul (alcoolul etilic) este oxidat în prezenţa oxigenului din aer, sub acţiunea echipamentului enzimatic al bacteriilor acetice, în acid acetic ca produs principal al fermentaţiei.

Istoric şi caractere taxonomice ale bacteriilor acetice

Pentru prima dată sunt izolate în 1837 de către F.T. Kützing din oţet. Primele studii sistematice ale acestor bacterii sunt făcute de L. Pasteur (1868) care arată că acestea sunt responsabile pentru transformarea alcoolului în acid acetic. Pe parcursul anilor, acestea au fost incluse în diferite genuri cu denumirea de: *Mycoderma* (Persoon 1822), *Acetobacterium* (Ludwig 1898), *Acetomonas* (Orla-Jensen 1909). Denumirea de *Acetobacter* este propusă de Beijerink în 1909, în 1935 Asai propune diferenţierea bacteriilor acetice în două genuri: *Acetobacter* şi *Gluconobacter* (în care erau incluse bacterii care produc acid gluconic). În 1954, Leifson în funcţie de mobilitate, separă bacteriile genului Acetobacter în două genuri, respectiv *Acetomonas* (gen care prezintă caractere comune cu g. *Gluconobacter*) şi *Acetobacter*.

În clasificarea lui Bergey, bacteriile acetice sunt incluse în Fam. *Pseudomonadacee* (g. *Acetobacter* şi g. *Gluconobacter*).

În prezent, prin studii genetice se consideră că ambele genuri trebuie regrupate în aceeaşi familie: *Acetobacteriacee*.

Caractere morfologice şi fiziologice ale bacteriilor acetice

Bacteriile acetice sunt bacterii strict aerobe sub formă de bastonaşe, Gram-negative, grupate în perechi sau lanţuri, cu dimensiuni variabile (0,5-0,8)(0,9-4,2)μm. Pot fi imobile sau mobile, cu cili polari sau peritrichi. În mediu acid, în timp, pot apare forme de involuţie, ramificate, care îşi pierd capacitatea de reproducere.

În medii lichide (staţionar) se dezvoltă sub forma unui voal fragil care cu creşterea în dimensiuni ascensionează pe pereţii vasului (*A. ascendens, A. aceti*). Alte specii: *A.xylinum, A. xilinoides*, formează un strat gelatinos de natură ß.glucanică (coloidal şi fibros) în vin oţeţit sau în oţet.

Bacteriile acetice sunt mezofile (temperatura optimă 30°C) şi produc fermentaţia acetică într-un domeniu larg de temperaturi 0-35°C. Au o termorezistenţă scăzută în mediu lichid cu pH acid, inactivarea lor are loc la 60°C/min., în timp ce bacteriile reţinute pe suporturi solide (doage de lemn) sunt inactivate la temperaturi mai ridicate (100°C).

Bacteriile acetice sunt tolerante la acid şi concentraţii de până la 2° acetice activează creşterea celulară. Rezistenţa la acid acetic se poate explica prin aceea că membrana acestor bacterii are un conţinut ridicat în acizi graşi saturaţi, motiv pentru care este relativ impermeabilă la acidul acetic care se găseşte sub formă nedisociată în mediile fermentate industrial.

Valoarea optimă de pH pentru creştere este 5,5 şi pH-ul limită 2,5.

Au un echipament enzimatic complex în care sunt prezente dehidrogenaze foarte active, localizate în sisteme membranare cuplate cu lanţul citocromic, enzime ale ciclului Krebs, ş.a. care le permite oxidarea a aproximativ 80 de compuşi (alcooli, glucide, acizi organici).

Dintre **sursele de carbon** utilizate preferenţial, alcoolul etilic este oxidat la acid acetic, iar glucoza la acid gluconic, acid 5-cetogluconic. Bacteriile din g. *Acetobacter* pot să oxideze şi acetaţii când alcoolul etilic a fost consumat din mediu, deoarece alcoolul etilic inhibă activitatea enzimelor de oxidare a acetatului la CO_2 şi H_2O. Important este că acidul acetic inhibă propria sa oxidare la concentraţii mai mari de 8° acetice, la pH=3.

Ca **surse de azot** pot să folosească sărurile de amoniu, aminoacizii şi peptidele. De aceea ele se pot dezvolta în medii minerale numai dacă se adaugă extract de drojdie. Bacteriile acetice sunt auxotrofe faţă de vitamine; acid para-aminobenzoic, niacina, tiamina şi acidul pantotenic.

Bacteriile sunt răspândite în natură pe produse vegetale (fructe, frunzi, flori) şi transportul lor este favorizat de insecte (musculiţa de oţet: Drosophilla) şi nematode (Anqvilula aceti).

W. Hennerberg propune o clasificare tehnologică a bacteriilor acetice în funcţie de cantitatea de acid acetic produsă, concentraţia de alcool din mediu şi biotop, în patru grupe:

1. Bacterii acetice din plămadă: *Gluconobacter suboxidans şi Acetobacter industrium*.
2. Bacterii acetice din bere: *A. aceti* - suportă 11% alcool şi poate produce 6,6% acid acetic. *A pasteurianum* suportă 9,5% alcool şi produce 6,2% acid acetic. Alte specii: *A. kutzingianum, A. rancens.*
3. Bacterii acetice din vin; *A. orleans* - poate produce 9,3 acid acetic; *A. ascendens, A. xilinum* suportă 7% alcool şi produce 4,5° acid acetic şi alţi produşi secundari.
4. Bacterii acetice de fermentaţie rapidă, izolate din acetatoare, au o mare capacitate de acidifiere, cu speciile A. *schützenbachii* (11-14°acetice), *A. acetigenum, A. curvum*.

Biochimismul fermentației acetice (Fig. 50)

Fermentația acetică se desfășoară după reacția globală:



$$CH_3\text{-}CH_2\text{-}OH + O_2 \rightarrow CH_3\text{-}COOH + H_2O$$

Din punct de vedere energetic, prin oxidarea alcoolului etilic rezultă 455 kj/mol (6 moli ATP)

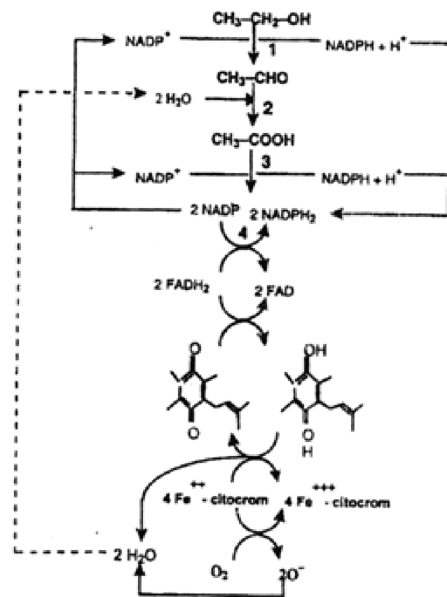


Fig. 50. Biochimismul fermentației acetice

Alcoolul etilic este oxidat în aldehidă acetică în prezența alcool-dehidrogenazei (1). Are loc legarea chimică a unui mol de apă (2) și se formează acet-aldehida-hidratată care în prezența aldehid dehidrogenazei (3) cedează $2H^+$ care este transferat de către enzime ale catenei respiratorii celulare (4) pe oxigenul molecular și se acumulează acid acetic - produs principal al fermentației.

Importanța practică a fermentației acetice

Deoarece obținerea vinului se cunoaște de peste 10000 de ani, se presupune că și obținerea oțetului are aceeași vechime. Obținerea industrială este descrisă din 1670 și în prezent producția mondială anuală depășește 106 t/acid acetic pur, obținut prin fermentarea diferitelor materii prime: soluții alcoolice, vin, cidru, malț, bere, orez. În cazul materiilor amidonoase, se face

în prima etapă zaharificarea, apoi fermentația alcoolică cu drojdii și în final are loc acidifierea cu bacterii acetice selecționate. Consumul pe cap de locuitor pe an poate varia între 0,2-38 l (A.H. Rose).

Un acetator simplu este format dintr-un vas tronconic înalt, umplut cu rondele de stejar, prevăzut cu sistem de aerare și recirculare a mediului de cultură, până la atingerea concentrației de 9-10 grade acetice. La pornirea fermentației se face sterilizarea rondelelor și pulverizarea suspensiei de bacterii acetice care rămân fixate în fibrele lemnoase și în prezența mediului răspândit uniform și a aerului are loc acumularea oțetului. În acest procedeu randamentul de conversie a alcoolului la acid acetic este de 75-80%.

Performanțe superioare cu automatizarea proceselor se obțin cu generatorul de oțet Frings și alte sisteme în care randamentul de conversie este de 95%. (Fig. 51)

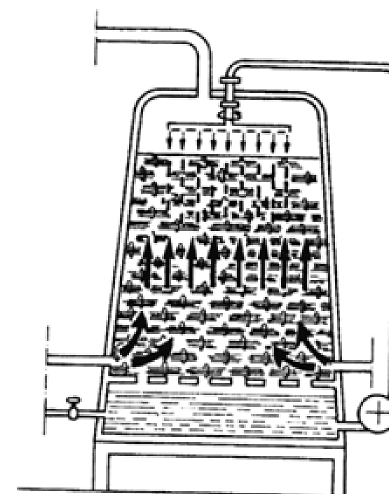


Fig. 51. Reprezentarea schematică a acetatorului

După obținere, oțetul își îmbunătățește calitățile senzoriale ca urmare a reacțiilor de esterificare și formare a compușilor de aromă.

Fermentația acetică spontană, întâlnită la fermentarrea boabelor de cacao, are un rol pozitiv în formarea compușilor de aromă și obținerea unor boabe de calitate superioară.

Bacteriile acetice *A. xylinum* pot fi folosite pentru obținerea de β glucani folosiți la fabricarea de membrane filtrante pe bază de acetat de celuloză.

Gluconobacter suboxidans poate fi folosit pentru oxidarea manitolului în fructoză și a glicerolului în dehidroxi-acetonă folosită în cosmetică.

Importanță practică o are și oxidarea sorbitolului și formarea de L-sorboză, materia primă în sinteza acidului L-ascorbic (vitamina C).

Fermentația acetică nedorită a vinului, berii, păstrate cu "gol de aer" conduce la deprecierea calității lor. În cazul vinurilor, procesul este considerat o boală, deoarece acrirea are loc în întregul volum, deși bacteriile acetice aerobe se dezvoltă la suprafață. Acidul acetic format sub voal are o densitate mai mare decât a alcoolului încât se produce o circulație a compușilor reactanți care conduce la acrirea totală a produsului.

FERMENTAȚIA GLUCONICĂ

Fermentația gluconică este un proces oxidativ simplu prin care glucoza, în prezența oxigenului din aer și a sistemului enzimatic al microorganismelor selecționate este transformată în acid gluconic ca produs principal.

Agenții tipici ai fermentației gluconice sunt bacteriile din g. *Gluconobacter (Acetomonas)*, g. **Moraxella** și mucegaiuri din genul *Aspergillus: A. niger, A. phoenicis, A. wenti* și ale genului *Penicilium: P. chrysogenum, P. luteum.*

Biochimismul oxidării biologice a glucozei (Fig. 52)

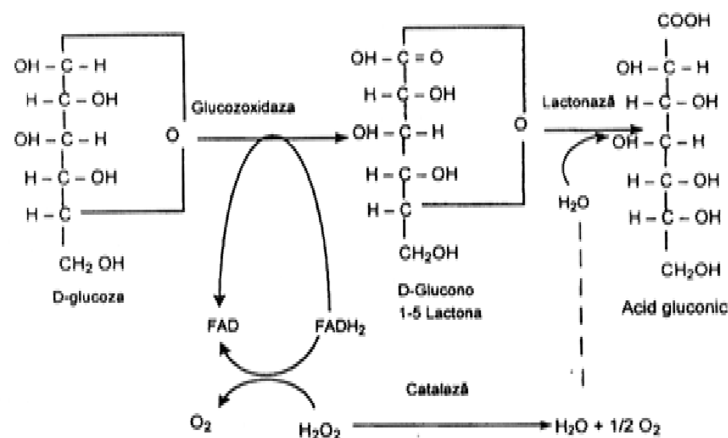


Fig. 52. Biochimismul fermentației gluconice

Importanța practică a fermentației gluconice

Acidul gluconic se obține pe cale fermentativă prin culturi de suprafață folosind ca substrat melasa diluată (10-20% zaharoză), repartizată în tăvi cu suprafață mare. După inoculare cu spori ai mucegaiului selecționat acesta se dezvoltă la suprafață formând o dermă groasă ce produce lent oxidarea glucozei rezultată prin inversia zaharozei. Procedeul este lent și în ultimii ani a fost înlocuit cu metode submerse cu aerare, în bioreactoare în care procesul este accelerat și randamentul de conversie al glucozei la acid gluconic este de 80-90% în timp de 18 ore la 25-30°C și pH=3. Prin adăugare de carbonat de calciu se formează gluconatul de calciu, din care prin procedee chimice se purifică acidul gluconic.

Biomasa rezultată în perioada fermentării poate fi valorificată pentru recuperarea glucozoxidazei intracelulare. Dintre multiplele aplicații ale acidului gluconic, mai importante sunt următoarele:

- folosirea gluconaților de Ca și Fe, în terapeutică.
- la obținerea prafului de copt
- Gluconolactona produs intermediar al fermentației este folosit în industria preparatelor de carne, deoarece le conferă un gust acrișor, impiedică activitatea bacteriilor de putrefacție și menține culoarea roșie naturală a compoziției salamurilor (tip Tivoli).
- Acidul gluconic în amestec cu soda caustică este folosit pentru îndepărtarea rapidă a sărurilor insolubile de magneziu.
- Acidul 2 ceto-gluconic este folosit la obținerea acidului D-araboascorbic - substanță cu efect antioxidant folosit la prevenirea râncezirii alimentelor cu conținut ridicat în lipide.

FERMENTAȚIA CITRICĂ

Fermentația citrică este un proces oxidativ complex prin care substratul glucidic (zaharoza) este metabolizat la compuși intermediari de oxidare cu acumulare în mediu a acidului citric ca produs principal.

Producerea acidului citric cu ajutorul mucegaiurilor din g. *Aspergillus* este cunoscută din 1913 (patent Zahorski) și pe scară industrială din 1923, ca urmare a cercetărilor efectuate de Currie. O primă fabrică de producere a acidului citric a fost construită în 1928 în Praga, proces care a fost extins și în alte țări. În țara noastră, fabrica de acid citric Giurgiu - preia procedeul prin cultivare de suprafață asigurând necesarul de acid citric pentru industria alimentară.

Agenți tipici ai fermentației citrice sunt tulpini selecționate ale speciei *Aspergillus niger* care produc activ citrat sintetază. Acidul citric se poate obține cu un bun randament (52 g.dm^{-3}) și prin cultivarea drojdiilor cu specia *Candida oleophilla*, pe medii cu parafine.

În condiții normale mucegaiurile nu acumulează acizi organici care sunt metabolizați prin ciclul acizilor tricarboxilici (Krebs). Pentru creșterea randamentului în acid citric, când pentru fermentație se folosește ca materie primă melasa, aceasta se tratează cu ferocianură de potasiu pentru îndepărtarea prin precipitare a: Mg, Fe, Zn, Cu, metale care influențează producerea de acid.

Ca rezultat al eliminării acestora, crește activitatea enzimei de condensare, în schimb enzime ale ciclului Krebs: aconitat - hidratază care necesită fier și izocitrat dehidrogenaza care necesită mangan, în absența cofactorilor trec în stare inactivă și deci este oprită secvența biochimică de transformare a acidului citric prin ciclul Krebs și astfel se acumulează în mediul de cultură.

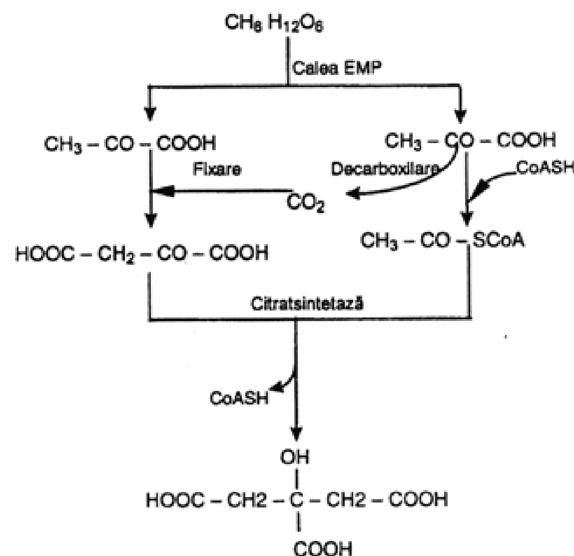


Fig. 53. Biochimismul fermentației citrice

Producerea industrială a acidului citric

Prin culturi de suprafață pe medii cu melasă diluată tratată cu ferocianură de potasiu, după sterilizare și răcire în tavă, se inoculează cu spori de *A. niger*. (3-4 g spori/100 m^2 suprafață mediu) și fermentarea are loc la 30-35°C. La suprafață se dezvoltă o dermă cu suprafață cutată prin creșterea aerobă a miceliului (vegetativ și reproducător). Fermentația durează 6-8 zile cu un randament de conversie a zaharozei în acid citric de 70-72% (1 m^2 suprafață miceliu poate să producă 500-800 g acid citric în 24 h). După separarea biomasei, aceasta poate fi valorificată ca sursă de enzime/proteine, iar din mediul fermentat prin metode fizico-chimice se separă acidul citric cristalizat.

Acidul citric se poate obține și prin metode submerse în bioreactoare cu aerare dirijată, prin procedee discontinue sau continue, cu reducerea duratei de fermentație și creșterea randamentului la valori de 80-85% în acid citric.

Importanța fermentației citrice

Acidul citric este principalul acid folosit în industria alimentară, pentru fabricarea băuturilor răcoritoare, a produselor zaharoaze.

Este folosit în calitate de conservant al culorii produselor păstrate in stare congelată, are proprietăți antioxidante și rol de anticoagulant al sângelui.

În industria farmaceutică intră în componența pulberilor efervescente.

Citratul de sodiu este recomandat în compoziția detergenților, înlocuind fosfații, care prin deversare în ape favorizează proliferarea excesivă a algelor.

Acidul citric sub formă cristalizată prin încălzire la 170°C se transfo în acid itaconic utilizat la fabricarea rășinilor schimbătoare de ioni.

Fermentații oxidative diverse

Prin fermentații oxidative (aerobe) se mai pot obține și alți acizi, exemplu: **acidul fumaric** cu culturi din g. *Aspergillus, Penicillium*, import pentru obținerea aldehidei maleice, materie primă pentru obținerea rășini sintetice.

Acidul kojic obținut prin cultivarea lui *Aspergillus oryzae* este folosit reactiv în chimia analitică și intră în compoziția unor insecticide.

Acidul ustilagic obținut cu culturi de micromicete ale g. *Ustilago* es folosit în industria parfumurilor.

Este important de subliniat că fermentațiile au loc în mod spontan condiții naturale, favorizând transformarea compușilor organici din mate nevie în compuși mai simpli, accesibili pentru alte grupe de microorganism transformări ce permit un circuit natural al carbonului.

CAPITOLUL 9
TRANSFORMĂRI MICROBIENE ALE COMPUŞILOR ORGANICI MACROMOLECULARI

Se apreciază că din energia radiaţiilor solare care cad anual pe pământ, echivalentă cu $3x10^{24}$J convertită prin fotosinteză în energia chimică a combinaţiilor organice se acumulează $2x10^{11}$ tone C/an. Din această biomasă vegetală cea mai mare parte o constituie celuloza, substanţele pectice, amidonul şi în cantităti mai reduse; lipide, acizi nucleici ş.a.

9.1. DESCOMPUNEREA AMIDONULUI ŞI GLICOGENULUI

Transformările acestor polioze poate fi produsă de microorganisme ce produc enzime extracelulare care produc hidroliza acestor compusi macromoleculari la molcule simple (glucoză, maltoză) ce pot fi transportate prin membrana celulară.

Dintre enzimele microbiene care hidrolizează amidonul fac parte: α-amilaza, β-amilaza şi glucoamilaza, enzime extracelulare elaborate de bacterii, mucegaiuri şi drojdii.

Bacteriile genului Bacillus: *B. subtilis, B. subtilis var. amyloliquefaciens, B. licheniformis, B. macerans, B. sthearothermophillus* sunt producătoare de α-amilaze active la 55-60°C, termostabile şi folosite pentru obţinerea amilazelor industriale.

Alte specii ale genului ca: *B. cereus, var. mycoides, B. megaterium, B. polymixa* sunt producătore de β-amilază, enzimă zaharogenă, care prin hidroliza legăturilor α 1-4 glucozidice eliberează molecule de maltoză.

Mucegaiurile produc mai ales α-amilază şi glucoamilază (*Aspergillus, Mucor şi Rhizopus*) diferitele specii diferenţiindu-se prin raportul între α-amilază şi glucoamilază.

Dintre buni producători de α-amilaze fac parte *Aspergillus niger şi Aspergillus oryzae*, tulpini selecţionate ce produc enzime stabile în domeniul acid şi care au o termorezistenţă inferioară amilazelor bacteriene. Dintre speciile producătoare de glucoamilază (amiloglucozidază); *A. awamori, A. usami, A. niger, Rhizopus delemar*, active la pH acid (4-4,5) şi temperaturi de 55-65°C cu temperaturi de inactivare mai mari de 65-70°C.

Deşi se cunosc aproximativ 100 de specii de drojdii care produc α-amilază şi glucoamilază, mai importante sunt specii ale genului *Saccharomycopsis* cu speciile *S. bispora, S. fibuligera*, genurile *Schwanniomyces, Trichosporon, Candida*.

Hidroliza enzimatică a amidonului, cu enzime vegetale (din malţ) sau enzime microbiene cu formare de glucide fermentescibile este un proces cu mare importanţă practică în biotehnologia spirtului, a berii, a panificaţiei sau pentru obţinerea siropurilor dulci, a dextrinelor, a maltozei, a glucozei cristalizate ş.a.

Desigur că degradarea amidonului în condiţii naturale prezintă o pierdere, iar materiile prime (seminţe, cereale) sau produse alimentare bogate în amidon, suferă uşor mucegăirea şi deprecierea tocmai pentru că amidonul este o sursă importantă de carbon şi energie pentru microorganismele capabile să producă amilaze inductive, extracelulare.

9.2. DESCOMPUNEREA CELULOZEI, HEMICELULOZEI

Celuloza este un poliglucid foarte răspândit în materiile prime de origine vegetală şi în structura pereţilor celulari ai fungilor. Celuloza ajunsă în sol şi ape după moartea plantelor este transformată în timp sub acţiunea microorganismelor capabile să producă enzime celulozolitice şi anume a micromicetelor - agenţi ai putrezirii şi a unor bacterii aerobe şi anaerobe. Hidroliza generală a celulozei are loc după schema (Fig. 54)

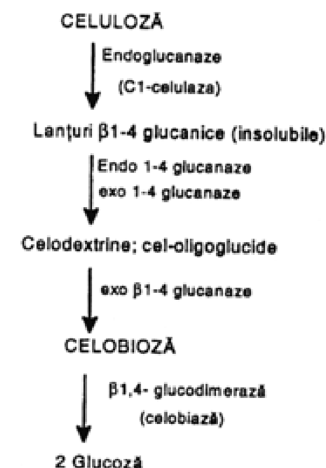


Fig. 54. Hidroliza enzimatică a celulozei

Produşii intermediari de hidroliză sunt metabolizaţi în mod diferenţiat în funcţie de natura microorganismelor şi prezenţa/absenţa oxigenului din aer.

Degradarea aerobă a celulozei, se caracterizează prin formarea de celobioză sau glucoză, a hidroxiacizilor şi prin oxidare se eliberează CO_2 şi H_2O. Dintre bacteriile aerobe care asimilează celuloza fac parte bacterii cu forme spiralate aparţinând genurilor: *Cytofaga, Cellvibrio, Cellulomonas.* Dintre micromicete, au activitate celulozolitică superioară specii ale genurilor: *Botryotinia, Fusarium, Mucor, Rhizopus, Trichoderma şi Tricothecium.* Dintre acest culturi, o importanţă industrială o au bacteriile din genul *Cellulomonas*, care pot fi cultivate aerob pe deşeuri vegetale, hârtie ş.a., iar biomasa rezultată prin înmulţire este valoroasă prin conţinutul în proteine (46,2%).

Prin studiul compoziţiei proteinei în aminoacizii esenţiali se constată prezenţa în cantitate mare a lizinei (7,6g/100 g proteine), la valori egale cu cea existentă în lapte, iar metionina în concentraţie de 2,01 g/100 g proteină, egale cu cea din proteina de referinţă FAO. Dintre fungi, tulpini selecţionate age genului *Trichoderma, Trich.reesei (viridae) şi Aspergillus (A. niger)* sunt buni producători de celulaze şi folosite industrial ca surse de enzime.

Pe cale aerobă, ca urmare a unor relaţii de sinergism între grupe de microorganisme ale aceluiaşi biotop, este posibilă şi degradarea ligninei când în asociaţie se află *Mucor racemosus, Merulis lacrimans* ş.a.

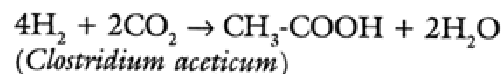
Degradarea anaerobă a celulozei, are loc permanent în sedimente şi în mâlul apelor, la fermentarea compostului, în rumenul ierbivorelor, în profunzimea solului, în soluri inundate, lacuri termale.

În transformarea celulozei se pot distinge trei etape, în funcţie de natura produselor de fermentaţie.

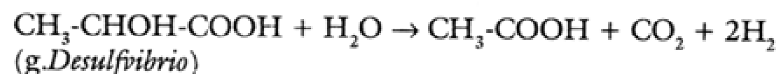
După hidroliza celulozei la compuşi simpli sub acţiunea unei microbiote heterogene alcătuite din bacterii anaerobe şi facultativ anaerobe din familia Enterobacteriaceae, Bacillaceae (G. *Clostridium*) se acumulează alcooli şi acizi, CO_2, H_2. Produsele rezultate în acest stadiu sunt folosite de **bacteriile acetogene** producătoare de acid acetic pe cale anaerobă, astfel:



$$4CH_3OH \rightarrow CH_3\text{-}COOH + 2CH_4 + 2H_2O$$
(bacterii metilotrofe, g *Methanobacillus*)



$$4H_2 + 2CO_2 \rightarrow CH_3\text{-}COOH + 2H_2O$$
(*Clostridium aceticum*)



$$CH_3\text{-}CHOH\text{-}COOH + H_2O \rightarrow CH_3\text{-}COOH + CO_2 + 2H_2$$
(g.*Desulfvibrio*)



$$CH_3\text{-}CH_2\text{-}COOH + 2H_2O \rightarrow CH_3\text{-}COOH + CO_2 + 3H_2$$
(g. *Desulfvibrio*)

În etapa a III-a denumită metanogenă sunt active bacteriile metanogene strict anaerobe din g. *Methanobacterium (M. ruminantium, M. formicicum, M. mobilis, M. farkeri ş.a.)* (Fig. 55).

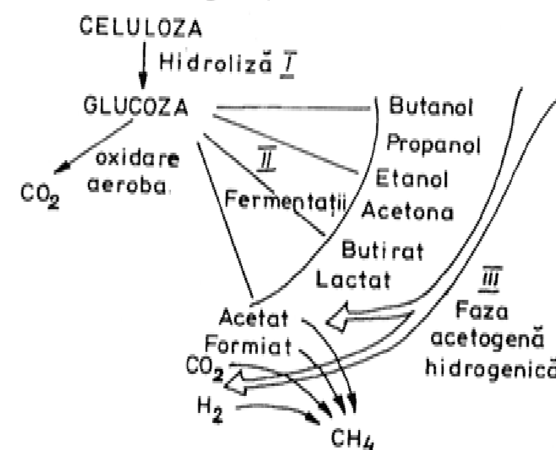
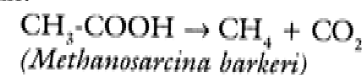


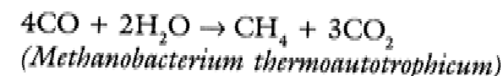
Fig. 55. Formarea metanului pe cale microbiană

Bacteriile anaerobe pot folosi acidul acetic ca sursă energetică şi produc metan:



$$CH_3\text{-}COOH \rightarrow CH_4 + CO_2$$
(Methanosarcina barkeri)

Cu atomi marcaţi s-a constatat că 73% din metan rezultă din acidul acetic format în faza acetogenă. Metanobacteriile pot forma metan prin reacţiile:



$$4CO + 2H_2O \rightarrow CH_4 + 3CO_2$$
(Methanobacterium thermoautotrophicum)

În afara acestor procese naturale care explică formarea zăcămintelor de metan, în ultimele decenii metanogeneza dirijată în scopul obţinerii de biogaz, prin prelucrarea microbiologică a dejecţiilor animale ia amploare, deoarece se realizează concomitent protecţia mediului şi valorificarea energetică a metanului şi a hidrogenului.

Conversia compuşilor reziduali are loc în metanotancuri, când în primul stadiu se observă o scădere a concentraţiei de oxigen şi hidrogen, urmează

stadiul de degradare activă a CO_2 și H_2, apoi are loc reducerea acestor gaze și se acumulează **biogazul**, în care concentrația de metan reprezintă 60-80%. Durata procesului de formare a metanului poate fi de 180-500 zile; biogazul eliberează prin ardere are o energie echivalentă cu 194,4 kcal/mol (811 kj/mol). După stagnarea procesului de metanogeneză, mediul rezidual, bogat în microorganisme poate fi folosit ca îngrășământ biologic.

Un nou combustibil care se poate obtine prin fermentarea anaerobă a celulozei este **hidrogenul**; dacă la arderea unui kilogram de metan se eliberează 1200 kcal, la arderea aceleași cantități de hidrogen se obțin 28.000 kcal.



$$2\,H_2 + O_2 \rightarrow 2\,H_2O + 11\ \text{kcal/mol}$$

Procesul poate fi dirijat prin folosirea a 2 culturi microbiene: alge microscopice și bacterii care produc hidrogen. Bacteriile care au viteză mare de creștere, necesită surse minime de C și energie și au capacitatea de a transforma acești compuși, în condiții anaerobe, la temperaturi optime de 60°C.

Reacția generală:



$$C_6H_{12}O_6 + H_2O \rightarrow 2H_2 + 2CO_2 + C_2H_5OH + CH_3COOH$$

În fermentația hidrogenică a celulozei cantitatea de gaze rezultate reprezintă 1/3 din celuloză, când fermentarea se produce cu *Baccilus cellulose hidrogenicus, Bacillus cellulose dissolvens* (temperatura optimă, 35°C) și *Clostridium thermocellus* (T_0=65°C).

9.3. DEGRADAREA SUBSTANȚELOR PECTICE

Substanțele pectice sunt conținute în cantitate mare în fructe, legume, tulpini, rădăcinoase sub formă de protopectină insolubilă, parțial asociată cu arabanii pereților celulelor vegetale, cu celuloză și alte polioze. După recoltarea fructelor, legumelor, în timpul conservării lor sau în straturile superficiale ale solurilor, prin activitatea microorganismelor are loc hidroliza substanțelor pectice având ca efect înmuierea țesutului vegetal și pierderea rezistenței lui față de agenții de putrezire.

Protopectina insolubilă poate fi transformată în pectină solubilă-heteropoliglucid format din acizi poligalacturonici solubili în apă (acizi D-poligalacturonici legați prin legături α-1, 4-esterificați cu alcool metilic) sub acțiunea protopectinazei produse de mucegaiuri și bacterii.

Pectina, sub acțiunea pectin-metilesterazei este hidrolizată la acizi pecti - respectiv acizi poligalacturonici neesterificați, care eliberează acizi D galacturonici, sub acțiunea catalitică a poligalacturonazelor.

Dintre bacterii, produc pectin-metilesteraze cele ale g. *Erwini Xanthomonas* și *Bacillus (ex. B. polimixa)*, mucegaiuri, cu speciile *Penicilliu chrysogenum, Aspergillus niger, ale genurilor Fusarium și Selerotinia*. Agen producători de poligalacturonaze: *Aspergillus niger, Botryotinia, Penicilliu expansum, Byssochlamys fulva și Clostridium felsineum*. Dintre aceste tulpi sunt performante *Aspergillus niger și Botriotinia fuckeliana (Botrytis cinerea)* care se folosesc pentru obținerea de endo și exopoligalacturonaze folosite în industria sucurilor de fructe, preparate care trebuie să fie lipsite de pectinesteraze care catalizează hidroliza legăturilor externe ale pectinei solubile cu eliberar de alcool metilic (toxic pentru organismul uman).

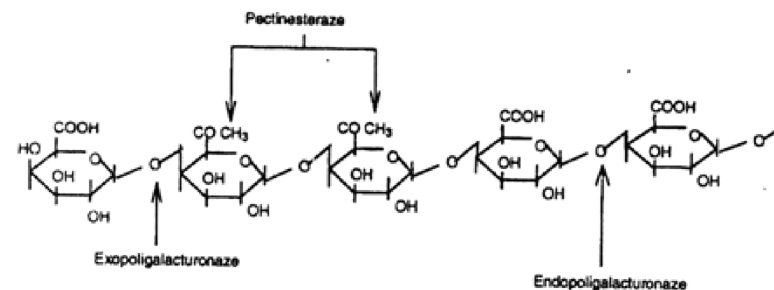


Fig. 56. Hidroliza enzimatică a substanțelor pectice

Descompunerea naturală a substanțelor pectice este folosită în România, la "topirea" inului și a cânepii, care are loc după imersarea plantelor în apă, sub acțiunea bacteriilor din speciile: *Pseudomonas fluorescens, Clostridium felsineum, Granulobacter pectinovorum.*

9.4. DESCOMPUNEREA LIPIDELOR

Lipidele prezente în materia nevie, de origine vegetală și animală care ajung în habitaturi naturale, precum și cele conținute în materii prime (seminte oleaginoase) sau produse alimentare pot suferi transformări sub acțiunea microorganismelor producătoare de lipaze extracelulare.

Sub acțiunea lipazelor are loc hidroliza lipidelor cu formare de glicerol ce poate fi metabolizat pe calea EMP și acizi grași, care sunt metabolizați pe calea β-oxidării cu eliberarea de acetil-CoA din lanțul hidrocarbonat al acestora și o cantitate de energie folosită de celula microbiană pentru creștere,

reproducere şi întreţinerea funcţiilor vitale. Astfel prin oxidarea completă a acidului palmitic (până la CO_2 şi H_2O), se eliberează o cantitate de energie echivalentă cu 130 moli de ATP.

Lipazele sunt sintetizate de numeroase microorganisme: mucegaiuri (*g. Rhizopus, g. Mucor, g. Aspergillus, g. Fusarium, g. Penicillium, g. Geotrichum ş.a.*) şi drojdii ale *g. Candida*.

Prin dezvoltarea microorganismelor lipolitice pe materii prime oleaginoase, produse cu conţinut ridicat în lipide (smântână, unt, margarină ş.a.) are loc o pierdere a valorii alimentare, ca urmare a râncezirii hidrolitice.

Cu microorganisme selecţionate ale *g. Rhizopus şi Aspergillus*, se pot obţine preparate enzimatice cu activitate lipazică ce pot fi utilizate la fabricarea brânzeturilor pentru îmbunătăţirea aromei, în terapeutică împreună cu lipaza pancreatică pentru îmbunătăţirea digestiei, şi în industria detergenţilor.

9.5. DEGRADAREA ACIZILOR NUCLEICI

Acizii nucleici conţinuţi în toate celulele eucariote şi procariote şi în particolele virale, pot fi degradaţi pe cale microbiană de către microorganisme care pot sintetiza ribonucleaze şi dezoxiribonucleaze. Pot produce degradarea acizilor nucleici cu formarea de 2,3 - ciclonucleotide şi fosfaţi, bacterii ale genurilor: *Staphylococus, Bacillus, Clostridium ş.a.*

Referitor la acizii nucleici conţinuţi în produse alimentare (de origine vegetală, animală sau microbiană) în organismul uman, bazele purinice din componenţa acizilor nucleici sunt transformate în acid uric cu o solubilitate mică, ce se elimină normal prin urină. Când în alimentaţie se foloseşte biomasă microbiană (SCP), deoarece în celula microbiană conţinutul în acizi nucleici este mai mare decât în celulele vegetale/animale, OMS recomandă ca în dietă conţinutul de acizi nucleici să nu depăşească 2 g/24 ore. La depăşirea dozei, în plasma sanguină şi urină, creşte concentraţia în acid uric şi apare risc de îmbolnăvire (gută). La alte organisme: peşti, amfibii, animale (vite, porci), sub acţiunea uricazei, acidul uric este transformat în alantoină, compus mai solubil, încât consumul de produse cu un conţinut ridicat de acizi nucleici/purine nu este dăunător.

9.6. DEGRADAREA CHITINEI ş.a.

Chitina - poliglucid cu azot - prezent mai ales în aripile insectelor, la viermi, moluşte, dar şi în structura pereţilor celulari ai fungilor poate fi degradată sub acţiunea **chitinazei**, produsă de *Pseudomonas chitinovorans,* cu eliberare de N-acetilglucozamină.

O degradare pe cale microbiană suferă şi **compuşii organici aroma[...]** (vitamine, aminoacizi), care sunt transformaţi de către mucegaiuri şi bact[...] în compuşi mai simpli: fumarat, acetoacetat, succinat.

Practic nu există compus organic, care să nu fie degradat la comp[...] simpli, ca urmare a adaptării microorganismelor; dacă acest fapt nu ar fi r[...] ar fi evidente acumulări în timp, catastrofe ecologice, dezechilibre natural[...]

9.7. TRANSFORMĂRI MICROBIENE ALE PROTIDELO[...]

Protidele sunt compuşi macromoleculari ce au în componenţă: C, H, O, N, S, P elemente cu rol vital pentru toate formele de viaţă. În celula vi[...] protidele au rol structural şi funcţional (enzime), iar după moartea fiziologi[...] a organismelor, prin procese de proteoliză enzimatică, protidele su[...] transformate în compuşi mai simpli ce pot servi, ca sursă de azot pent[...] microorganismele implicate în circuitul natural al azotului. Protidele conţinu[...] în materia organică nevie, care se acumulează în sol şi ape, prin moart[...] plantelor, animalelor, microorganismelor, pot fi hidrolizate sub acţiun[...] proteazelor extracelulare produse de către bacteri şi mucegaiuri - agenţi [...] putrefacţiei (degradarea protidelor de origine animală) şi ai putrezi[...] (degradarea protidelor de origine vegetală).

Spre deosebire de bacterii şi mucegaiuri, drojdiile nu pot folosi protid[...] în procesul de nutriţie deoarece ele conţin proteaze intracelulare, care se po[...] elibera din celule numai prin dezintegrarea învelişurilor celulare sau dup[...] moarte prin autoliză.

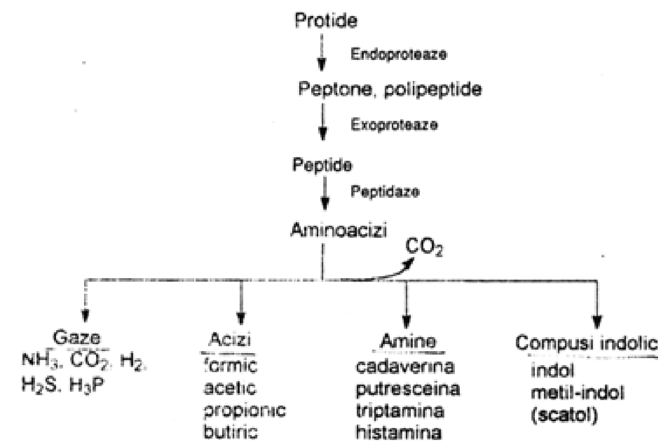
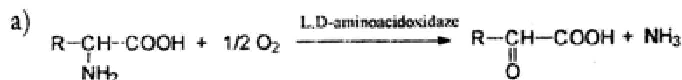


Fig. 57. Schema generală a proteolizei

Formarea produșilor finali ai putrefacției are loc prin dezaminarea aminoacizilor pe una din următoarele căi:

Dezaminare oxidativă

a)

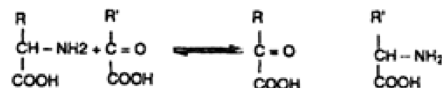


(Mucegaiuri, bacterii aerobe)

b) Prin hidroliză în prezența dehidrogenazelor specifice produse de bacterii ale genului *Bacillus, Clostridium*:



Escherichia coli produce 3 transaminaze și pot produce transaminarea cu piruvat în calitate de acceptor al grupării [-NH_2].



- **Dezaminarea desaturantă**, poate fi produsă de bacterii aerobe și anaerobe *(Proteus, Pseudomonas, Clostridium)*, după reacția generală:



- **Dezaminarea reductivă** e întâlnită la bacterii strict anaerobe ale genului *Clostridium*:



Decarboxilarea aminoacizilor are loc intracelular sub acțiunea aminoacid decarboxilazelor active mai ales în mediu acid, cu formarea de amine, după reacția generală:



Aminoacizi		**Amine biogene toxice**
ornitină	⟶	putresceină
lizină	⟶	cadaverină
triptofan	⟶	triptamină
histidină	⟶	histamină

Produșii intermediari ai proteolizei, cu molecule mici pot fi folosiți ca sursă de azot, carbon și energie, deoarece pot fi transportați și metabolizați intracelular.

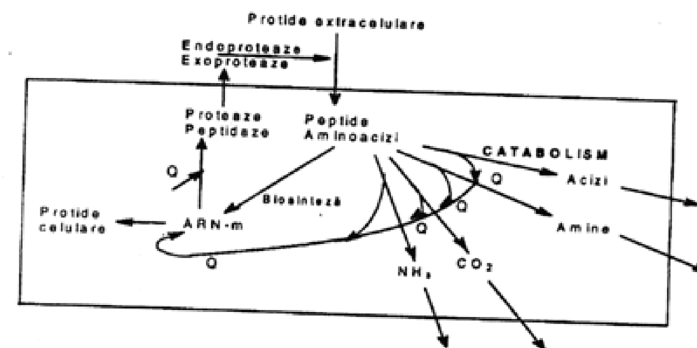


Fig. 58. Proteoliză

Proteoliza prezintă aspecte particulare în celula microbiană în funcție de starea fiziologică a celulei. Astfel în celula vie are loc **fenomenul de turn-over** prin care proteinele "vechi" care nu își mai îndeplinesc cu eficiență rolul lor funcțional sunt degradate intracelular până la aminoacizi, care vor servi drept "unități constructive" pentru biosinteza proteinelor noi, a enzimelor adaptive ș.a. (Zarnea, 1985)

Autoliza (proteoliza intracelulară) este un proces ireversibil, care conduce la moartea fiziologică a celulei, când în condiții vitrege de viață, în absența nutrienților, a apei și energiei necesare pentru biosinteză, aminoacizii rezultați prin transformarea proteinelor sunt în continuare catabolizați cu formarea produșilor finali ai putrefacției

Agenții microbieni ai procesului de degradare a protidelor

Pot produce enzime proteolitice majoritatea bacteriilor organotrofe, actinomicete și mucegaiuri.

Putrefacția este produsă de bacterii aerobe, facultativ anaerobe și strict anaerobe, care se dezvoltă optim pe produse cu pH...7 și activitatea lor este oprită la pH=4. Procesul este inițiat de către bacteriile aerobe care se pot dezvolta în mediu cu pH acid (4,5-5,5) și pregătesc condițiile pentru bacteriile anaerobe prin consum de oxigen și formarea produșilor intermediari de hidroliză: peptide și aminoacizi.

1) Bacteriile aerobe de putrefacție aparțin următoarele genuri:

1.1 **Genul Pseudomonas** - cu bacterii în formă de bastonașe drepte sau curbate, mobile cu cili polari și Gram negative. Sunt strict aerobe, catalazo-

pozitive și pot să crească într-un interval de temperaturi de la +4°C la +43°C, producând alterarea alimentelor (carne, lapte etc.) păstrate în condiții de refrigerare. Produc proteaze cu activitate optimă între 30 și 45°C și pH între 6,5 și 8, caracterizate printr-o termostabilitate ridicată (D_{140}=1-2 minute).

Habitatul lor obișnuit este solul, apa dulce, apa de țărm a mărilor. Majoritatea speciilor sunt saprofite dar se cunosc și specii patogene (P. *aeruginosa* - bacterie de putrefacție, prezentă în ape naturale, ape de canal, pe vegetale, produse alimentare, de unde ajungând pe piele produce infecții purulente. P. *mallei* este agentul morvei, trasmisibilă la om).

Dintre bacteriile de putrefacție frecvent întâlnite fac parte P. *fluorescens*, P. *putida*, P. *putrefaciens*, P. *fragi* bacterii psihrotrofe, implicate în alterarea cărnii refrigerate. Genul cuprinde 29 specii bine studiate și alte 236 insuficient definite, având caractere de gen.

1.2. **Genul Bacillus** (28 specii), cu bacterii sporogene Gram pozitive, aerobe și mezofile. Dintre bacteriile de putrefacție frecvent întâlnite ca agenți de alterare: *Bacillus subtilis, Bacillus cereus, Bacillus megatherium, B. sthearothermophillus, B. coagulans*. Ele produc hidroliza gelatinei și prin degradarea aminoacizilor cu sulf eliberează H_2S.

Bacillus subtilis produce catalază, poate hidroliza amidonul și protidele. Este aerob. *B. cereus* se prezintă sub formă de bastonașe (1-1,2) (3-5) μm cu capete ușor rotunjite, în lanțuri scurte, se dezvoltă la o temperatură minimă 15-20°C și maximă 35-45°C.

Dintre speciile patogene *B. anthracis*.

1.3. **Genul Proteus** - cuprinde bacterii nesporulate mobile, Gram negative, dau lichefierea gelatinei. Specii răspândite: *Proteus vulgaris* și *Proteus mirabilis*.

Alte bacterii de putrefacție mai aparțin g. *Flavobacterium* și g. *Alcaligenes*, agenți de alterare a cărnii, peștelui, în condiții de refrigerare.

2) Bacterii facultativ anaerobe de putrefacție aparțin g. *Escherichia, Enterobacter, Enterococcus* (streptococii fecali), sunt de origine fecală, Gram negative nesporulate.

3) Bacteriile anaerobe pot fi sporulate sau nesporulate și în dezvoltarea lor pe un produs intrat în putrefacție se observă o anumită succesiune. În primele 2 zile sunt prezente bacterii din g. *Micrococcus, Staphylococcus*; după 3-4 zile predomină *Bacillus putidum* și *Clostridium sporogens* și după 7-8 zile, *Clostridium putrificus. Diplococcus griseus, Bacillus postumus*, bacterii care produc atât hidroliza protidelor, cât și a lipidelor.

Genul Clostridium include bacterii cu formă de bastonașe mari, izolat sau în lanț, anaerobe, Gram pozitive, sporogene, majoritatea mobile.

Clostridiile proteolitice - degradează protide, inclusiv cafeina, produc H_2S, hidrolizează gelatina (*C. sporogenes, C. putrefaciens, C. perfringens, C. nigrificans* ș.a.).

Pentru punerea în evidență a bacteriilor de putrefacție într-un produs alimentar, după omogenizare și antrenarea microbiotei în ser fiziologic steril acesta se inoculează în eprubete cu apă peptonată 1% și după 24 ore de activitate se vor pune în evidență produșii finali ai proteolizei (amoniac, H_2S, indol), capacitatea bacteriilor de a produce hidroliza gelatinei prin teste biochimice (teste H pentru evidențierea H_2S; I pentru indol și L - lichefierea pe cale enzimatică a gelatinei) (D. Bărzoi, 1985)

BIBLIOGRAFIE

Anghel I., Toma N., et al., **1989**, *Biologia și tehnologia drojdiilor*, Ed. T Bucureşti, v.1.

Anghel I., Vassu T., Herlea V., Dan V., et. al., **1991**, *Biologia și tehnol drojdiilor*, Ed. Tehnică, Bucureşti, v.2.

Anderson Dean A., Rodney J. Sobietski, **1980**, *Introduction to Microbiology*, London.

Anon I., **1988**, *Food Biotechnology*, Can.Inst.Food Sci Tecnhol.J. 21, 4, 334-339

Antoncenko I., **1986**, Fizica vodî, Kiev.

Bannikova L.A., Koroleva N.S., Semenihina V.E., **1987**, *Mikrobiologhiceskie osnovî malocinovo proizvodstvo*, Moskva.

Barnett J.A., R.W. Payne, D. Yarrow, **1979**, *A guide to identifying and classifying yeast*, Cambridge Univ.Press, London.

Barry D.R., **1982**, *The biology of yeasts*, Ed. Arnold, London.

Bâlbâie V., **1987**, *Bacteriologie medicală*, Editura medicală, Bucureşti.

Bârzoi D. **1983**, *Microbiologia produselor de origine animală*, Ed. Ceres, Bucureşti.

Becher M.E., **1987**, *Anabiozî mikroorganiymov*, Riga.

Bekker Y. E., **1988**, *Fiziologhia i biochimia gribov*, Moskva.

Bourgeois C.M., Mescle J.F., Zucca J. (coord), **1996**, *Microbiologie alimentaire*, Collection Sciences et technique agroalimentaires, Technique & Documentation, Paris, v.1.

Braunstein A.E., **1987**, *Proţesî i fermentî kletocinovo metabolisma*, Moskva.

Cotea V.D., **1985**, *Tratat de oenologie*, Ed. Ceres, Bucureşti.

Crueger W., Crueger A., **1990**, *Biotechnology*, A textbook of Inds. Microbiology, USA.

Dan V., **1977**, *Microbiologie industrială*, Univ. Galaţi.

Dan V., Picu M., **1988**, *The bioeffect of Low Frequency ultrasounds upon the Technological Quality of yeast*, Ştiinţe şi tehn. alim., p. 89-92.

Dan V., Răducan A., Stoicescu A., Nicolau A., **1996**, *Effect of estherparabens upon biotechnological processes in brewery*, Roum. Biotech. Lett., vol. 1, nr. 3, p.181-190.

Dan V., Kramer C., Brahrim G., Nicolau A., Zara M., **1999**, *Memorator pentru drojdii*, Ed. Evrika, Galaţi.

Dan V., Kramer C., Bahrim G., Nicolau A., Zara M., **1999**, *Memorator pentru mucegaiuri*, Ed. Evrika, Galaţi.

J.W. Deacon, **1984**, *Introduction to Modern Mucology*, Blochwell Scientific Publication.

Duca E., Duca M., Furtunescu G., **1979**, *Microbiologie medicală*, Ed. did. şi pedag., Bucureşti.

Elinov H.P., *Himiceskaia microbiologhia*, Moskva, **1989**.

Fassatiova O., **1986**, *Moulds and filamentous fungi in technical microbilogy*, Progresses in Industrial Microbiology, v. 22.

Florescu M., **1986**, *Biotehnologia în noua revoluţie ştiinţifică şi tehnică*, Lucrările simpozionului de Microbiologie Industrială şi Biotehnologie, Iaşi, p. 5-16.

Gorbuleva V.G., **1984**, *Promâşlenaia microbiologhia I uspehi genetisceskoi inginerie*, Moskva.

Grinevici A.G., Bocenko N.M., **1986**, *Tehniceskaia microbiologhia*, Minsk.

Jay M. James, **1970** (Ed. I), **1992** (Ed. a IV-a), *Modern Food Microbiology*, Ed. IV, Avi Book, New York.

Junghietu G.I., **1982**, *Hranenie piscevîh produktov i kormov s primeneniem conservantov*, Chişinău.

Kidby D.K., Davies R., **1970**, *Invertase and Disulphide Bridges in the Yeast Wall*, J. of. Gen. Microbiology, 61, p. 327-333.

Konovalov S.A., **1990**, *Biohimia drojei*, Moskva.

Lachance M.A., **1985**, *Current views on the yeast species*, Microbiological Science, 2, 4, p. 122-126.

Lenges J., **1992**, *Les mitrates et nitrites dans alimentation*, Cerevisiae and Biotechn. 2, p. 59-61.

Matveev V.E., **1981**, *Osnovî aseptiki v tehologighii cistih mikrobiologhiceskih preparatov*, Moskva.

Moţoc D., **1962**, *Microbiologie industrială*, Ed. Tehnică.

Nudeli L.S., A.V. Korotkevici, **1980**, *Mikrobiologhia I biohimia vina*, Moskva.

Pivovarov I.P., Lapenkon M.I., Mereniuk G.V., **1982**, *Opredeteli sanitarno-znacinih microorganizmov*, Kisinev.

Prescott L.M., Harley J.P., Klein D.A., **1990**, *Microbiology*, W.C. Brown Publish.

Rose H., **1978**, *Primary products of metabolism*, Ac. Press.

Sacnko N.F., **1980**, *Droji iz Brettanomyces*, Vinogr. i vinod., 3, 25-29.

Schlegel H.G., **1987**, *Allgemeine Mikrobiologie*, Georg Thieme Verlag, Stuttgart - New York.

Smidt P. **1987**, *Theoretical and experimental studies on the influence of ultrasound on the cell/enzymes*, Biotechn. and. Bioeng., p. 928-935.

Smith J.E., Berry D.R., **1978**, *The filamentous fungi*, Ac. Press.

Stanier Y. Adelberg, **1977**, *General microbiology*, Prentice Hall Inc. USA.

Zimmermann F.C., Entian K.D., **1997**, *Yeast Sugar Metabolism*, Tehnomic Publ.

Zarnea G., **1984**, *Tratat de microbiologie generală*, Ed. Academiei, vol. 2.

POSTFAŢĂ

Microbiologia produselor alimentare este rezultatul unei experienţe acumulate în 40 de ani de activitate didactică în domeniul fascinant al microbiologiei şi a oportunităţii oferite de grantul major de cercetare (1998-2000) câştigat de colectivul de microbiologie al facultăţii de Industrie Alimentară, Acvacultură şi Pescuit, Universitatea „Dunărea de Jos“ din Galaţi care a permis editarea cărţii.

După acest prim volum care îşi propune familiarizarea celor interesaţi cu principalele grupe de microorganisme cu rol important în industria alimentară şi a modului în care poate fi controlată şi dirijată activitatea lor metabolică, urmează volumul 2 (cu editare planificată la sfârşitul acestui an), în care va fi prezentată microbiologia materiilor prime şi a produselor finite, culturile starter şi rolul lor în biotehnologii alimentare, tipurile de alterări microbiene, controlul microbiologic al produselor alimentare.

Cu speranţa utilităţii şi a înţelegerii de către cititori, a efortului de a culege şi alege din multitudinea de informaţii, pe cele mai semnificative, doresc să mulţumesc mai tinerelor mele colege, dr. ing. Margareta Zara, dr. ing. Gabriela Bahrim şi dr. ing. Anca Nicolau pentru înţelegere, sprijin şi îndemn în finalizarea acestei lucrări.

Prof. univ. Valentina Dan
Dr. în Microbiologie tehnică

CUPRINS